

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de efectos inmunes sobre el tumor,
de mecanismos de resistencia y de las
características biológicas de la terapia *Celyvir***

***Study of immune effects on the tumor,
resistance mechanisms and
biological characteristics of Celyvir therapy***

Lidia Franco Luzón

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



**Estudio de efectos inmunes sobre el tumor,
de mecanismos de resistencia y de las
características biológicas de la terapia *Celyvir***

***Study of immune effects on the tumor,
resistance mechanisms and
biological characteristics of Celyvir therapy***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Lidia Franco Luzón

Graduada en Ciencias Biológicas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Para optar al **Grado de Doctor en Medicina y Cirugía**
por la Universidad Autónoma de Madrid

Bajo la dirección de:

Dr. D. Manuel Ramírez Orellana

Dra. D^a. África González Murillo

La presente memoria de Tesis Doctoral titulada *“Estudio de efectos inmunes sobre el tumor, de mecanismos de resistencia y de las características biológicas de la terapia Celyvir”* (*“Study of immune effects on the tumor, resistance mechanisms and biological characteristics of Celyvir therapy”*) ha sido realizada por Lidia Franco Luzón, graduada en Biología, bajo la dirección del Dr. Manuel Ramírez Orellana y la Dra. África González Murillo, en el laboratorio de Oncología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid.

Opta al grado de Doctor en Medicina y Cirugía:

Lidia Franco Luzón

Director

Dr. Manuel Ramírez Orellana

Director

Dra. África González Murillo

Tutor

Prof. Luis Madero López

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada con los siguientes proyectos:

- Proyecto de Investigación en Salud PI13/02487: *“Estudio de los mecanismos de acción de la terapia con Celyvir en tumores infantiles: hacia la optimización de los resultados clínicos”*. Instituto de Salud Carlos III.
- Proyecto de Investigación en Salud PI16/02008: *“Búsqueda de biomarcadores asociados a la respuesta clínica en niños con cáncer tratados con Celyvir”*. Instituto de Salud Carlos III.
- Proyecto *“Celyvir frente a tumores sólidos refractarios”*. Asociación Pablo Ugarte.

A mi familia

A mis amigos

A Rubén

«Cada vez que he descubierto que me había equivocado, o que mi trabajo había sido imperfecto, y cuando he sido desdeñosamente criticado e incluso he sido sobrevalorado hasta tal punto que me sintiera mortificado, mi mayor consuelo ha sido decirme a mí mismo cientos de veces que he trabajado tanto como podía y lo mejor posible, y que nadie puede hacer más que esto».

Charles Darwin

*«El verdadero viaje del descubrimiento
no consiste en buscar nuevos paisajes,
sino en mirar con nuevos ojos».*

Marcel Proust

*«La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos:
es una manera de pensar.»*

Carl Sagan



AGRADECIMIENTOS

Muchas veces he oído (o leído) que los agradecimientos son “la parte más complicada de escribir” en cualquier tesis doctoral. En mi caso, eso no es cierto. Son muchas las personas que durante todos estos años han contribuido en mayor o menor medida a que esta tesis doctoral salga adelante, y tengo en mente mi agradecimiento a todas y cada una de ellas. Pido disculpas por adelantado si este apartado se hace extenso, pero creo que es la única oportunidad que tendré de plasmar esa gratitud y reconocimiento hacia todas esas personas que me han acompañado en este largo viaje.

En primer lugar, tengo que agradecer de todo corazón a Manuel Ramírez el que me hiciera un hueco en su pequeño laboratorio y me brindara la oportunidad de realizar el doctorado en unos tiempos en los que no era fácil encontrar un lugar para comenzar la carrera investigadora. Manuel no ha sido sólo el director de mi tesis, sino, como a él le gusta decir, mi “padre espiritual”: de él me llevo aprendidas muchas lecciones (“*Data is data*”) que estoy segura de que me serán útiles en el resto de mi vida profesional. Gracias por confiar en mí para realizar este trabajo y descubrirme que sí, que yo valía para eso de investigar. Lo único que me queda por decir es que espero haber estado a la altura de lo que se esperaba de mí.

En segundo lugar, debo dar las gracias a África, mi supervisora en el laboratorio y codirectora de esta tesis. Gran parte de los derroteros que ha tomado este trabajo no hubieran sido posibles sin sus aportaciones ni su experiencia. Gracias por haberme guiado a lo largo de todos estos años, sobre todo cuando los resultados no eran tan buenos como yo esperaba, y tú buscabas la manera de sacar cualquier cosa que nos permitiese seguir hacia delante.

Gracias también a Gustavo, que me supervisó en el “principio de mis tiempos” en el laboratorio, cuando llegué siendo una inexperta estudiante de máster. Gracias por tu paciencia y tu guía en esas primeras pautas tan básicas de trabajo en el laboratorio, que me han acompañado a lo largo de todos estos años y que espero mantener allá donde vaya. Y gracias también por todos los consejos, conversaciones y buenos ratos que vinieron después.

Pero más allá de lo que en mi cabeza siempre será “el núcleo duro” del laboratorio, también tengo mucho que agradecer a todas esas personas que han compartido mi día a día y que me han visto crecer y progresar, tanto profesional como personalmente.

A Lorena y Cristina, que más que compañeras de laboratorio, han sido grandes amigas y un apoyo incondicional durante toda esta etapa. Gracias por acompañarme al animalario, por darme ánimos en los días más duros, por las risas en las largas mañanas en la sala de cultivos, por alucinar con mis rarezas, por los cotilleos, por los “*A ti por venir*”, por los intercambios de recetas, por las charlas que tan bien venían para desconectar de vez en cuando y, en definitiva, por haber sido la mejor parte de ir al laboratorio todos los días (y, de paso, ahorrarme así unas cuantas sesiones de psicoanálisis). Lorena, sólo me queda desearte suerte y mucho ánimo en la etapa que viene, que será dura, pero te aseguro que culminará y te dejará cargada de buenos momentos. Cristina, a ti solo puedo ofrecerte todo mi cariño y desearte que disfrutes lo máximo

posible de este momento vital, que será irrepetible. Espero que siempre haya un hueco para un café o una buena charla, nos lleve a donde nos lleve la vida.

A Carmen, que me enseñó algunas lecciones de vida que han sido más valiosas que toda la ciencia del mundo. Gracias por haber sido tan auténtica y por esas charlas que me vinieron tan bien.

Agradecer también a Sara, Isa, Meri y Andrea ("*las blancas*") el haber estado ahí cuando ha hecho falta. Meri, a ti quiero mencionarte de manera especial, por tu buen ánimo, tu amabilidad y tu sonrisa permanente, por aportar siempre el punto de serenidad que a mí me faltaba en algunas ocasiones. También a Ana, que fue "*blanca*" un tiempo, y de quien me acuerdo muy a menudo, aunque ya no esté por estos lares.

A Míchel, cuya estancia entre nosotras fue breve pero intensa, y que siempre conseguía ponerme de buen humor (incluso en los momentos más desesperantes de la escritura de esta tesis doctoral) con esas referencias *frikis* que sólo entendíamos nosotros dos. Espero que todo te vaya bien y que en algún momento nuestros caminos vuelvan a cruzarse.

A las "*biocitométricas*", Sandra, Ana y Julia, por haber aportado ese puntito de humor y cariño en los largos ratos en citometría, que buena falta hacían (sobre todo en esos días que se hacían interminables). Un agradecimiento especial a ti, Julia, por haberte convertido no sólo en una buena compañera en lo profesional, sino en una gran amiga en lo personal; siempre has sabido arrancarme las mejores sonrisas con tu manera de pensar y de ver la vida. Una pequeña parte de mi crecimiento personal en esta etapa te lo debo a ti.

Gracias a Ana Lourdes, cuya experta mano de cirujana ha sido clave para desarrollar el modelo animal que se plasma en esta tesis. Agradecerte especialmente tu buena voluntad y tu disponibilidad incluso cuando la agenda ya no daba más de sí.

A Josune, por ser la hematóloga más *guay* y todoterreno que se ha aventurado a hacer algo en el loco mundo de la investigación. Gracias por escucharme cuando más falta me hacía y compartir conmigo esas interminables tardes de ordenador en el laboratorio. Ya sabes que te ganaste un lugar entre *las Maris*. Estoy segura de que conseguirás todo lo que te propongas.

A Elena, que empieza ahora su andadura en este mundo de la ciencia y la investigación y me ha recordado lo que es tener esa ilusión por empezar en algo nuevo que te apasiona. Ánimo.

También a Manu, Bea, Isa, Sandra, Carmen, Asun, y a todos los que alguna vez han pasado por el laboratorio y, a su manera, han conseguido animarme, a veces sin ser conscientes de ello. A Lorea, Ana y el resto de las chicas de citometría, por su amabilidad cuando íbamos a pedirles un anticuerpo o nos colábamos en el citómetro. A Jesús, Edilia y todo el personal del animalario del CIEMAT, por ocuparse del mantenimiento de nuestros animales y tratar siempre de facilitarnos la tarea. A Nines, Lidia y todo su equipo, por habernos ayudado cuando hizo falta, sobre todo en lo relativo a las histologías de nuestros animales.

Gracias también a Rebeca y Sandra del ICO-IDIBELL, cuya ayuda y conocimientos bioinformáticos han sido esenciales para obtener unos resultados tan interesantes. Parte de esta tesis doctoral es también vuestra.

A las personas maravillosas que conocí en el laboratorio del Dr. Paul Crocker en Escocia, por enseñarme cómo se hace ciencia en otras partes del mundo. *Special thanks to Allie, for being the best office mate I could ever wish for, and for being the most hard-worker PhD student I have ever met – you taught me a lot of great and valuable lessons. And lots, lots of thanks to Emma, for having become a great friend overseas – I hope to keep your friendship over the years and I wish you the best of success. I hope we can keep meeting at least once a year.*

Una mención especial merece la Asociación Pablo Ugarte. Sin ellos y su aportación no hubiera sido posible que yo hubiese realizado esta tesis doctoral. Los resultados de este trabajo son también mi reconocimiento a su esfuerzo y dedicación como asociación. Ojalá con este trabajo estemos “un paso más cerca de dejar a los oncólogos en paro”.

Más allá del mundo de la ciencia han sido muchas las personas que han contribuido a mantenerme en pie incluso sin saberlo, dándome apoyo y fuerza para continuar. Una pequeña parte de esta tesis doctoral se la debo también a ellos.

Gracias infinitas a Marta, Gema y José, que empezaron esta andadura conmigo, mucho antes de embarcarme en la aventura del doctorado. Gracias por ser mis compañeros de pasiones y de ciencia, por los viajes, por las experiencias, y por haberos convertido en amigos de esos para toda la vida. Gracias por las risas y los buenos momentos de desconexión total. Habéis sido de las mejores cosas que me he llevado de la carrera y de este periodo de mi vida, y sólo me queda desearos un rotundo éxito en todo aquello que emprendáis. Lo que la Biología ha unido que no lo separe nadie.

Gracias también a Ray, Tamara, Sergio, Sonia, Agus y Rocío, por haber sido una constante y fuente de amistad durante muchos años. Y que nos quiten lo *bailao*.

A mis omnipresentes *flooders*, Raúl, Miriam y Gonzalo. Parece mentira la cantidad de años que han pasado, y todos los buenos momentos que he compartido con ellos. A vosotros tengo que daros las gracias por las risas y las reuniones hasta horas intempestivas, aunque hayan sido menos de las que nos hubiera gustado. Que no se pierdan las buenas costumbres.

A todos mis compañeros del *Legado*, especialmente a Sergio y a Ricardo, por haber constituido una de mis principales válvulas de escape cada día durante todos estos años. Ellos han sido siempre una constante, y a quienes acudía sabiendo que el buen rato estaba asegurado (“Ay, pues gracias”).

Un agradecimiento muy especial, el mayor de todos, va para mi familia. Para mis abuelas, que no saben muy bien qué es eso de que su nieta sea “doctora”, pero que se hinchan de orgullo cada vez que se lo mencionan. Gracias también a mi padre, mi madre y mi hermano Daniel, por ser los mayores responsables de que haya llegado a donde estoy ahora. Gracias, papá y mamá,

por vuestro apoyo incondicional, por haberme educado siempre en la cultura del esfuerzo, por haberme transmitido la importancia de hacer lo que a uno le apasiona, por haberme dado la libertad y los medios para estudiar lo que quise, y por haberme escuchado pacientemente cuando contaba “las cosas de mi carrera o de mi tesis” (incluso sin comprender muy bien de qué estaba hablando). Gracias, Daniel, por todos esos buenos momentos entre hermanos, que se han vuelto más habituales en los últimos años; sabes que siempre podrás contar con tu hermana mayor. Aunque a veces no lo parezca o no sea capaz de transmitirlo, vosotros tres sois los pilares más importantes de mi vida, el motivo de que hoy sea quien soy y haya conseguido lo que he conseguido. Os quiero.

Rubén, a ti tengo que agradecértelo todo. Gracias por ser mi compañero de vida, por haber recorrido este largo y arduo camino conmigo desde mucho antes de que yo misma fuera consciente de que había empezado. Gracias por haber tenido infinita paciencia conmigo durante tantos años: soportaste mis años de carrera, y también has soportado todo lo que ha conllevado esta tesis doctoral. Has aguantado mis cambios de humor, mis horarios raros, mis quejas, mis enfados y los días que llegaba tan cansada que no me apetecía ni hablar, y a pesar de todo eso (o por todo eso), aquí estás. Esta tesis es también tuya. Gracias por tu cariño y tu buen humor, que es lo más valioso que tengo. Gracias por ser tú, por ser como eres, y por quererme tal como soy. *Aishiteru*.



ABREVIATURAS

Abreviaturas:

A

ABHD2: *Abhydrolase Domain Containing 2*

Ad: Adenovirus

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

AGL: *Amylo-Alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase*

ALK: *Anaplastic lymphoma kinase* (Quinasa de linfoma anaplásico)

ANNs: *Artificial neural networks* (Redes neurales artificiales)

ApoA4: Apolipoproteína A-4

ApoB: Apolipoproteína B

ARG1: Arginasa 1

ARG2: Arginasa 2

ARN: Ácido ribonucleico

ASIC5 *Acid Sensing Ion Channel Subunit Family Member 5*

B

BCL6: Proteína 6 del linfoma de células B

BMP: Proteína morfogenética de hueso

BMP: *Bone morphogenetic protein* (Proteína morfogénica ósea)

Breg: Linfocito B regulador

C

CAR: *Chimeric antigen receptor* (Receptor antigénico quimérico)

CCL2: Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)

CCR1: Receptor de quimioquinas C-C tipo 1

CCR4: Receptor de quimioquinas C-C tipo 4

CCR7: Receptor de quimioquinas C-C tipo 7

CELSR3: *Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3*

CHMP2A: *Charged Multivesicular Body Protein 2A*

CLEC5A: *C-type lectin domain family 5 member A*

CM: *Central memory* (Memoria central)

CO₂: Dióxido de carbono

COSMIC: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

CPA: Célula presentadora de antígeno

CR: Constant region (Región constante)

CREG1: *Cellular repressor of E1A stimulated genes 1*

CXCL12: Quimioquina C-X-C tipo 12

CXCR4: Receptor de quimioquinas C-X-C tipo 4

CXCR5: Receptor de quimioquinas C-X-C tipo 5

D

DC: *Dendritic cell* (Célula dendrítica)
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*
DNAH9 *Dynein Axonemal Heavy Chain 9*
DNAse1 Deoxyribonucleasa 1

E

E1A: *Adenovirus early region 1A* (Región temprana de adenovirus 1A)
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EEM: Error estándar de la media
ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EM: *Effector memory* (Memoria efectora)
EPHB3: *Ephrin type-B receptor 3*
ESTIMATE: *Estimation of STromal and Immune cells in MAlignant Tumor tissues using Expression data*

F

FASN: Fatty Acid Synthase
FBS: *Fetal bovine serum* (Suero fetal bovino)
FDA: *Food and Drug Administration*
FER: Proteína quinasa FER.
FGA: Cadena alfa del fibrinógeno
FGB: Cadena beta del fibrinógeno
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

G

GALNT15 *Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 15*
GLMN: Glomulina
GMP: Good manufacture practice
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis* (Análisis de enriquecimiento génico)
Gy: Gray
GZMA: Granzima A
GZMB: Granzima B

H

HAVCR2: *Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2* (TIM3)
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
HGFR: Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HLA: *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitario humano)
HSV: Herpesvirus

I

ICAM1: Molécula de adhesión celular 1
IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN γ : Interferón gamma
IL-10: Interleuquina 10
IL-12: Interleuquina 12
IL-1A: Interleuquina 1A
IL-1B: Interleuquina 1B
IL-2: interleuquina 2
IL-3: interleuquina 3
IL-4: interleuquina 4
IL-6: interleuquina 6
IL-6R: Receptor de la interleuquina 6
iNOS: Óxido nítrico sintasa
INSS: International Neuroblastoma Staging System
IQGAP1: *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*
ITR: *Inverted Terminal Repeat Sequences* (Secuencias repetidas terminales invertidas)
IV: Intravenosa

L

LAG3: *Lymphocyte-activation gene 3* (Gen activador de linfocitos 3)
LRP1B: *LDL Receptor Related Protein 1B*

M

M: Molar
mAdv: Adenovirus murino
MAPK: MAP quinasa
MAVS: *Mitochondrial Antiviral Signaling Protein* (Proteína de señalización mitocondrial antivírica)
mCelyvir: Celyvir murino
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1
M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor* (Factor estimulante de colonias de macrófagos)
MDSC: Mieloid-derived suppressor cell (Célula mieloide supresora)
mEGF: *Murine epidermal growth factor* (Factor de crecimiento epidérmico murino)
MEMO1: *Mediator of cell motility 1* (Mediador de la movilidad celular 1)
mFGF: *Murine fibroblastic growth factor* (Factor de crecimiento fibroblástico murino)
mg: Miligramo
MHC: Molécula de histocompatibilidad
mL: Mililitro
MMP-1: Metaloproteasa 1
MMP-10: Metaloproteasa 10
MMP-12: Metaloproteasa 12
MMP-14: Metaloproteasa 14

MMP-7: Metaloproteasa 7
MMP-9: Metaloproteasa 9
mMSC: *Murine mesenchymal stem cells* (Células mesenquimales murinas)
MO-MSC: Células mesenquimales de médula ósea
MOI: *Multiplicity of infection* (Multiplicidad de infección)
MSC: *Mesenchymal stem cell* (Célula troncal mesenquimal)
MTA: Medicamento de terapia avanzada
MTD: *Maximum tolerated dose* (Dosis máxima tolerada)
MUC16: Mucina 16

N

NB: Neuroblastoma
NCF: Normas de correcta fabricación
NDRG1: *N-Myc Downstream Regulated 1*
NGS: *Next generation sequencing*
NK: Célula *Natural killer*
Ng: Nanogramo
nm: Nanómetro
NOD2: *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*
NTRK2: *Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2*

P

P/S: Penicilina/estreptomicina
PABPC1 *Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1*
PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados a patógenos)
pb: Pares de bases
PBS: *Phosphate buffered saline* (Fosfato tamponado salino)
PCBP2: Poly(rC)-binding protein 2
PCR: *Polimerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)
PD1: Programmed death 1 (Proteína de muerte programada 1)
PDGF-AB: Platelet derived growth factor AB (Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB)
PDL1: *Programmed death-ligand 1* (Ligando 1 de muerte programada)
PDL2: *Programmed death-ligand 2* (Ligando 2 de muerte programada)
PECAM1: *Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1* (Molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales 1)
PGE2: Prostaglandina E2
pRb: proteína fosforilada del retinoblastoma
PRF1: Perforina 1

Q

qPCR: PCR cuantitativa
quantIseq: *Quantification of the Tumor Immune contexture from human RNA-seq data*

R

RAB29: Oncogén de la familia RAS 29
RAGE: Receptor de productos glicosilados
Rb: Retinoblastoma
RIPK2 (*Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2*)
RNA-Seq: Secuenciación de RNA
rpm: revoluciones por minuto
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

S

SERPINE1: Serpina 1
sIL-6R: Receptor soluble de interleuquina 6
SNV: *Single nucleotide variants* (Variantes de un único nucleótido)
SRMS: Proteína quinasa SRMS
STING: *Stimulator of interferon genes* (estimulador de genes de interferón)

T

TAE: Tris-acetato-EDTA
TAM: *Tumor associated macrophage* (Macrófago asociado a tumor)
TCR: *T-cell receptor* (Receptor de célula T)
TD: *Terminally differentiated* (Terminalmente diferenciado)
TG: Transgénico
TGF- β : *Tumor growth factor β* (Factor de crecimiento tumoral β)
TH: Tirosina hidroxilasa
TIB: *Tumor infiltrating B lymphocyte* (Linfocito B infiltrante de tumor)
TIGIT: *T cell Ig and ITIM domain*
TIL: *Tumor infiltrating lymphocyte* (Linfocito T infiltrante de tumor)
TILeu: Tumor infiltrating leukocyte (Leucocito infiltrante de tumor)
TIM3: *Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2* (HAVCR2)
TME: Tumor microenvironment (Microambiente tumoral)
TNFRSF10A: *TNF Receptor Superfamily Member 10a*
TNF α : *Tumor necrosis factor alfa* (Factor de necrosis tumoral alfa)
TRAF3: *TNF receptor associated factor 3*
Treg: Linfocito T regulador
TRPV6: *Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, member 6*

U

UCHL1 (*Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1*)

V

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VV: Vaccinia virus
VWF: Factor de von Willebrand

W

WES: *Whole Exome Sequencing* (Secuenciación de exoma completo)

WT: *Wild type* (Salvaje)

μ

μg: Microgramo

μL: Microlitro

μm: Micrómetro



ÍNDICE

Índice

RESUMEN	1
SUMMARY.....	5
1 – INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 – Neuroblastoma	11
1.1.1- Etiología y origen.....	11
1.1.2.- Diagnóstico y tratamientos actuales.....	11
1.1.3.- Neuroblastoma con amplificación MYCN.	12
1.1.4.- Inmunología tumoral e inmunoterapia.....	13
1.1.4.1- Generación de epítomos tumorales a partir de mutaciones puntuales.13	
1.1.4.2.- El microambiente inmune tumoral.	13
1.1.4.3.- Inmunoterapia en neuroblastoma... ..	16
1.2 – Viroterapia oncolítica como inmunoterapia	16
1.2.1.- Principio de la viroterapia oncolítica.....	16
1.2.2.- Tipos de virus oncolíticos y ensayos clínicos.....	17
1.2.3.- Estrategias de aplicación de la viroterapia oncolítica.	18
1.3 – Celyvir: la combinación de MSC autólogas y del adenovirus oncolítico ICOVIR-5.....	19
1.3.1.- El adenovirus oncolítico ICOVIR-5.....	20
1.3.2.- Células mesenquimales autólogas de pacientes.....	20
1.3.3.- Modelo murino de Celyvir.....	22
1.3.3.1.- Ratón TH-MYCN.....	22
1.3.3.2.- Adenovirus oncolítico murino MAV-1 dIE102... ..	23
1.3.3.3.- Células mesenquimales murinas.	24
2 – OBJETIVOS.....	27
3 – MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 – Características biológicas de Celyvir asociadas a respuesta clínica.	33
3.1.1 – Obtención de las células mesenquimales de pacientes.	33
3.1.2 – Cultivo de las células mesenquimales de pacientes.....	33

3.1.3 – El adenovirus oncolítico ICOVIR-5.	33
3.1.4 – Preparación de <i>Celyvir</i>	34
3.1.5 – Generación del secretoma de <i>Celyvir</i> (<i>Protein Profiling Service</i>).	35
3.1.6 – Estudio del transcriptoma de <i>Celyvir</i> (<i>RNA sequencing</i>).	35
3.1.7 – Análisis estadístico.....	35
3.1.8 – Validación de los resultados obtenidos en los analisis de transcriptoma y el secretoma de las células mesenquimales de los pacientes.	36
3.1.8.1 – Validación de los resultados del transcriptoma por PCR cuantitativa.	36
3.1.8.2 – Cuantificación de candidatos del secretoma por Luminex.....	36
3.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de <i>Celyvir</i>.	37
3.2.1 – Obtención y conservación de las muestras tumorales.....	37
3.2.2 – Purificación y cuantificación del ADN genómico (ADNg).	37
3.2.3 – Purificación y cuantificación del ARN de las muestras.....	38
3.2.4 – Análisis bioinformático.	38
3.2.5 – Análisis del microambiente tumoral de la paciente por PCR cuantitativa.	38
3.3 – Modelo murino de <i>Celyvir</i>.	39
3.3.1 – Ratones TH-MYCN.	39
3.3.1.1.- Gestión de la colonia.	39
3.3.1.2 – Genotipado.....	40
3.3.1.2.1 – Extracción de ADN.	40
3.3.1.2.2 – Cebadores de la reacción.....	40
3.3.1.2.3 – Genotipado por PCR convencional.	41
3.3.1.3 – Mantenimiento de los animales.....	42
3.3.2 – <i>Celyvir</i> murino.....	42
3.3.2.1 – Células mesenquimales murinas.	42
3.3.2.2 – Producción adenoviral.	43
3.3.2.3 – Cálculo del título adenoviral.....	44
3.3.2.4 – Cálculo de la multiplicidad de infección.	45
3.3.2.5 – Comprobación de la capacidad lítica de MAV-1 por <i>plaque assay</i>	45

3.3.2.6 – Comprobación de la capacidad replicativa de MAV-1 en células mesenquimales murinas.....	45
3.3.2.7 – Fabricación de <i>Celyvir</i> murino (<i>mCelyvir</i>).	46
3.3.3 – Modelo animal: tumor inducido por trasplante ortotópico.....	47
3.3.3.1 – Líneas celulares de neuroblastoma murino derivadas del ratón TH-MYCN.	47
3.3.3.1.1 – Cultivo de la línea celular 36769 en forma de neuroesferas.	47
3.3.3.2 – Inoculación de la línea tumoral en los animales 129/SvJ mediante trasplante ortotópico.	48
3.3.3.3 – Tratamiento de los animales 129/SvJ con <i>Celyvir</i> murino (<i>mCelyvir</i>).	48
3.3.4 – Modelo animal: tumor espontáneo en ratones TH-MYCN.	50
3.3.4.1 – Selección de animales transgénicos mediante genotipado.	50
3.3.4.2 – Tratamiento de los animales TH-MYCN con <i>Celyvir</i> murino (<i>mCelyvir</i>).	52
3.3.5 – Sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras extraídas.	52
3.3.5.1 – Sacrificio de los animales.....	52
3.3.5.2 – Procesado de los tumores... ..	53
3.3.5.3 – Procesado de la sangre.....	53
3.3.6 – Citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares inmunes en el tumor.....	54
3.3.7 – Estudios serológicos mediante técnica de ELISA.....	55
3.3.8 – Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa.	55
3.3.8.1 – Extracción de ARN.	55
3.3.8.2 – Reacción de la retrotranscriptasa inversa.	57
3.3.8.3 – Reacción de qPCR.	57
3.3.9 – Estudios de biodistribución y de cinética viral.	58
3.3.9.1 – Biodistribución del adenovirus murino en los distintos órganos.	58
3.3.9.2 – Cinética de las partículas virales en la sangre periférica.	59
4 – RESULTADOS	61
4.1 – Características biológicas de <i>Celyvir</i> asociadas a respuesta clínica.	63

4.1.1 – Análisis inicial de los resultados crudos del secretoma y del transcriptoma de <i>Celyvir</i> .	63
4.1.1.1 – Análisis del secretoma.	63
4.1.1.2 – Análisis del transcriptoma.	66
4.1.1.3 – Comparación combinada del transcriptoma y secretoma de las muestras.	66
4.1.2 – Análisis de enriquecimiento mediante GSEA.	68
4.1.3 – Análisis mediante aproximación de biología de sistemas.	70
4.1.3.1 – Proteínas diferenciales obtenidas en el análisis del secretoma.	71
4.1.3.2 – Genes diferenciales obtenidos en el análisis del transcriptoma.	75
4.1.4 – Validación de los candidatos obtenidos en los estudios del transcriptoma y del secretoma.	75
4.1.4.1 – Cuantificación de la replicación viral y validación de los genes responsables de la misma.	75
4.1.4.2 – Validación de genes candidatos responsables de las diferencias en la respuesta celular innata a la infección.	78
4.1.4.3 – Cuantificación de candidatos del secretoma.	79
4.1.5 – Representación gráfica de los procesos con CYTOSCAPE.	79
4.1.5.1 – Transcriptoma: Respuesta inmune frente al virus: NDRG1 y MAVS.	79
4.1.5.2 – Secretoma: Respuesta inmune frente al virus: IL-6 y CCL2.	81
4.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de <i>Celyvir</i>.	82
4.2.1 – Células inmunes infiltrantes del tumor durante la evolución de la enfermedad.	82
4.2.1.1 – Estimación de la actividad celular del tumor por inmunohistoquímica.	82
4.2.1.2 – Estimación de la pureza tumoral.	83
4.2.1.3 – Estimación de las poblaciones inmunes presentes en el tumor mediante diferentes algoritmos.	84
4.2.1.3.1 – Algoritmo ESTIMATE.	84
4.2.1.3.2 – Algoritmo QuanTiSeq.	86
4.2.1.3.3 – CIBERSORT.	87

4.2.1.3.4 – Proporción de la infiltración leucocitaria en las muestras tumorales a partir de los distintos algoritmos.....	88
4.2.2 – Repertorio clonal de linfocitos T infiltrantes del tumor durante la evolución de la enfermedad.....	92
4.2.3 – Perfil mutacional e identificación de mutaciones durante la evolución tumoral.....	94
4.2.3.1 – Estimación de la firma genética (<i>signature</i>) de ambos tejidos tumorales.....	94
4.2.3.2 – Perfil mutacional durante la evolución de la enfermedad.....	97
4.2.3.3 – Identificación de mutaciones tumorales durante la evolución usando la herramienta CONDEL.....	97
4.2.3.4 – Identificación de neoepítomos tumorales usando la herramienta NetMHC.....	100
4.2.4 – Análisis del estado del microambiente tumoral de la paciente en ambos momentos del tratamiento por PCR cuantitativa.....	102
4.3 – Modelo murino de Celyvir.....	103
4.3.1 – Caracterización de <i>Celyvir</i> murino.....	103
4.3.1.1 – Comparación de la capacidad de infección de MAV-1 en las células mesenquimales murinas y en la línea control 37.1.....	103
4.3.2 – Modelo murino inducido.....	107
4.3.2.1 – Efectos de la administración repetida de <i>Celyvir</i> in vivo.....	107
4.3.2.2 – Efectos locales en los tumores de ratones implantados y tratados con <i>Celyvir</i> sistémico.....	109
4.3.2.3 – Estudio de los leucocitos infiltrantes de tumor en el modelo inducido.....	112
4.3.2.4 – Estudio del microambiente tumoral en los ratones con neuroblastoma inducido.....	115
4.3.3 – Modelo murino espontáneo.....	116
4.3.3.1 – Terapia sistémica con <i>Celyvir</i> en modelo de neuroblastoma espontáneo.....	116
4.3.3.2 – Los ratones heterocigotos para el transgén (TH-MYCN TG) presentan una generación tumoral del 40% y muy variable en el tiempo.....	116

4.3.3.3 – Efectos locales en los tumores de ratones TH-MYCN tratados con <i>Celyvir</i> sistémico.	117
4.3.3.4 – Estudio de los leucocitos infiltrantes de tumor en el modelo espontáneo.....	119
4.3.3.5 – Estudio del microambiente tumoral en los ratones TH-MYCN con neuroblastoma espontáneo.	122
4.3.4. – Comparación de la infiltración leucocitaria basal y el estado del microambiente tumoral entre ambos modelos murinos de neuroblastoma.	122
5 – DISCUSIÓN	125
<i>5.1 – Características biológicas de Celyvir asociadas a respuesta clínica.</i>	<i>128</i>
<i>5.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de Celyvir.</i>	<i>133</i>
<i>5.3 – Modelo murino de Celyvir.....</i>	<i>141</i>
6 – CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	145
7 – BIBLIOGRAFÍA	151
8 – ANEXOS	177



RESUMEN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y su pronóstico cinco años tras el diagnóstico no es favorable en el 40% de los casos, ya que estos tumores son resistentes a varias líneas de terapia. Por ello, es necesario encontrar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de estos pacientes.

Nuestro grupo lleva más de una década desarrollando una terapia novedosa denominada *Celyvir*, un medicamento de terapia avanzada consistente en un adenovirus oncolítico introducido en una célula mesenquimal autóloga y administrado por vía sistémica. Hemos demostrado que el tratamiento es seguro y bien tolerado, pero es necesario optimizar el medicamento para incrementar la frecuencia de respuestas favorables al mismo. Por ello, esta tesis doctoral abarca tres de los aspectos más importantes para establecer estas mejoras de cara a la clínica.

En primer lugar, hemos identificado un perfil de célula mesenquimal más eficaz a la hora de distribuir el virus por el organismo a partir de técnicas de transcriptómica y proteómica, que permitirá en un futuro optimizar los tiempos y eficacia de la terapia mediante la selección o fabricación (por ejemplo, a partir de técnicas de edición génica como CRISPR-Cas9) de una célula mesenquimal universal.

En segundo lugar, hemos identificado cambios que se produjeron en el neuroblastoma de una paciente que experimentó estabilización de la enfermedad antes de sufrir una progresión clínica, y que es un ejemplo de adaptación y escape tumoral a la terapia *Celyvir*. Mediante técnicas de secuenciación del exoma y transcriptómica, hemos identificado un perfil inmune más activado durante la estabilización comparándola con el estado de progresión. Asimismo, hemos identificado posibles mutaciones surgidas durante la progresión clínica que pueden ser potencialmente interesantes como marcadores o dianas terapéuticas.

Por último, aunque llevamos muchos años administrando *Celyvir* a los pacientes en un régimen controlado, son muchas las cuestiones que aún no hemos podido resolver en cuanto a distribución del adenovirus por el organismo, su replicación o sus efectos sobre el componente inmune del tumor. Para ello, hemos establecido un modelo murino de la enfermedad y el medicamento que nos ha servido para estudiar todos estos aspectos. Hemos determinado que el tratamiento ejerce un efecto clínico favorable en estos animales, a niveles de infiltración inmune y remodelación del microambiente tumoral.



SUMMARY

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in children. Prognosis is poor, and 5-year survival can be as low as 40% in high-risk patients. Additionally, these tumors are usually resistant to multiple lines of therapy. Therefore, it is necessary to find new therapeutic strategies to improve prognosis for these patients.

Our group has been developing a novel therapy called *Celyvir* for over a decade. This advanced therapy drug consists of an oncolytic adenovirus introduced into an autologous mesenchymal stem cell which is administered systemically. We have shown that the treatment is safe and well tolerated, but it is necessary to optimize the medication to increase the frequency of favorable responses. Therefore, this doctoral thesis covers three important aspects for optimizing this therapy for clinical use.

First, we have identified a more effective mesenchymal stem cell profile for distributing the virus through the body. Transcriptomic and proteomic data have highlighted criteria for selection or manufacturing of a universal mesenchymal stem cell, for example by gene editing techniques such as CRISPR-Cas9.

Secondly, we have profiled one clinical case of tumor adaptation and escape to *Celyvir* therapy. Upon treatment, this neuroblastoma patient experienced stabilization of the disease, then a clinical progression. Through exome and transcriptomic sequencing techniques, we have identified a more activated immune profile during stabilization by comparing it with the state of progression. We have also identified possible mutations that arose during clinical progression that may provide novel disease markers or therapeutic targets.

Finally, although administration of *Celyvir* to patients is a controlled and established regimen, many issues persist. These include the distribution of adenovirus throughout the body, its replication and its effects on the immune component of the tumor. For this, we have established a murine model of the disease and the medication to facilitate investigation of these aspects. We have determined that the treatment has a favorable clinical effect in these animals. This is dependent on levels of immune infiltration and remodeling of the tumor microenvironment.

1. – INTRODUCCIÓN

1.1 – Neuroblastoma

1.1.1- Etiología y origen.

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia, representando aproximadamente el 6-10% del total de tumores infantiles^{1,2}, sólo superado por leucemias (que representan el 80% de todos los tumores infantiles) y por los tumores cerebrales³. La incidencia del neuroblastoma, sin embargo, no es muy alta, dado que se limita casi exclusivamente a niños menores de 15 años (siendo su diagnóstico especialmente frecuente en niños menores de 22 meses, y extremadamente raro en adolescentes y adultos jóvenes), y, por tanto, el neuroblastoma está considerado como enfermedad rara (aproximadamente 10 casos por millón de niños menores de 15 años)^{1,3}.

El cuadro clínico suele manifestarse como una gran masa, generalmente abdominal (65% de los casos), que a su vez se suele presentar más de la mitad de las veces sobre o próximo a la glándula adrenal, aunque la masa primaria también puede presentarse en otras localizaciones (cuello, pecho o pelvis)². El diagnóstico de la enfermedad suele ser tardío, ya que muchas veces el cuadro es asintomático o los síntomas son muy generales (fiebre, malestar, pérdida de peso).

El origen biológico del neuroblastoma se encuentra en las células progenitoras de la cresta neural, aunque aún existe controversia sobre qué subtipo de célula origina el neuroblastoma exactamente³. La cresta neural tiene su origen biológico en el ectodermo, y sus células progenitoras son precursoras de varios tejidos nerviosos y tipos celulares diferentes (entre los que se encuentran, entre otros, células de la glía, neuronas, melanocitos o cartílago)⁴. Se cree, por tanto, que durante el proceso de diferenciación de las células de la cresta neural se origina el neuroblastoma, formándose en muchas ocasiones al poco de nacer o incluso durante el periodo prenatal.

1.1.2.- Diagnóstico y tratamientos actuales.

El diagnóstico del neuroblastoma se basa en la presencia de ciertos rasgos histopatológicos característicos en el tumor primario o en aspirados de médula ósea, además de por otros parámetros². Los neuroblastomas se clasifican como favorables o desfavorables tomando en cuenta el grado de diferenciación del neuroblasto (célula tumoral) mediante técnicas de anatomía patológica⁵.

Además, dependiendo del estado de diseminación de la enfermedad en el momento del diagnóstico, el neuroblastoma se puede clasificar en varios estadios que influyen directamente en el tratamiento a aplicar, según el sistema INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) (Tabla 1)^{2,6-8}.

Estadio	Descripción
1	Masa primaria localizada en un lado del cuerpo, resecable por cirugía. No hay afectación de los ganglios linfáticos externos al tumor.
2A	Masa primaria localizada en un lado del cuerpo, no totalmente resecable por cirugía. No hay afectación de los ganglios linfáticos externos al tumor, aunque los ganglios linfáticos próximos pueden estar afectados.
2B	Masa primaria localizada en un lado del cuerpo, no totalmente resecable por cirugía. Existe afectación de los ganglios linfáticos externos al tumor, aunque no hay diseminación a otras zonas del cuerpo.
3	No existe diseminación a otras partes del cuerpo, pero se cumple al menos una de las siguientes condiciones: <ul style="list-style-type: none"> • La masa tumoral primaria ha invadido el lado contrario del cuerpo y no puede ser eliminada completamente por cirugía. • La masa tumoral primaria se encuentra localizada en un lado del cuerpo, pero hay afectación de los nódulos linfáticos del lado opuesto del cuerpo. • La masa tumoral primaria se encuentra en el centro del cuerpo y se extiende hacia ambos lados del mismo, con afectación de los nódulos linfáticos próximos.
4	El cáncer se ha extendido a otras partes distantes y otros órganos del cuerpo (medula ósea, hígado, nódulos linfáticos, etc), pero el paciente no cumple los requisitos para ser clasificado como estadio 4S.
4S	Sólo se da en niños menores de un año. La masa tumoral se encuentra localizada en un lado del cuerpo, con posible infiltración de los nódulos linfáticos del mismo lado, pero no del opuesto. Hay afectación de otros órganos, pero menos de un 10% de las células son cancerígenas. Existe la posibilidad de que la masa tumoral se reabsorba y desaparezca por sí misma.

Tabla 1: Estadios del neuroblastoma.

El tratamiento de los pacientes de neuroblastoma difiere ampliamente dependiendo del estadio en que se presente la enfermedad. Los estadios 3 y 4 son considerados de alto riesgo y por tanto su tratamiento incluye agresivas dosis de quimioterapia que incluye cisplatino, carboplatino, etopósido y ciclofosfamida (protocolo COJEC)^{9,10}. La quimioterapia va seguida de cirugía y, en algunos casos, radioterapia local. Los pacientes con riesgo medio se someten a ciclos menos agresivos de quimioterapia y cirugía. Los pacientes con riesgo bajo se someten en muchas ocasiones únicamente a cirugía. El estadio 4S, que se considera especial, habitualmente se resuelve por sí mismo por la reabsorción o la diferenciación del tumor primario¹¹⁻¹⁴. En el caso de los neuroblastomas de alto riesgo, la duración de la terapia es superior a un año y el porcentaje de supervivencia pasados cinco años no supera el 40%.

1.1.3.- Neuroblastoma con amplificación MYCN

El oncogén MYCN pertenece a una familia de factores de transcripción con tres miembros conocidos: MYCN, MYC (c-Myc) y MYCL. En circunstancias normales, el factor de transcripción MYCN está implicado en el desarrollo y diferenciación de las células neurales durante las primeras etapas del desarrollo^{15,16}. No obstante, su sobreexpresión en los tejidos fuera de las

etapas iniciales del desarrollo está asociada a la generación de tumores, especialmente en neuroblastoma. De todos los neuroblastomas de alto riesgo, el 25% muestran una amplificación anormal del oncogén MYCN¹⁷. En estos casos, es probable que los altos niveles de MYCN necesarios para el correcto desarrollo neuronal no disminuyan pasada esa etapa y la sobreexpresión continuada contribuya al desarrollo tumoral^{14,18,19}. La sobreexpresión del oncogén MYCN se asocia a neuroblastomas de mal pronóstico, y a pesar de que no está presente en todos los casos de neuroblastoma de alto riesgo, se ha puesto un especial interés en comprender su biología y cómo contribuye a la malignidad del tumor^{17,18}.

1.1.4.- Inmunología tumoral e inmunoterapia.

1.1.4.1- Generación de epítomos tumorales a partir de mutaciones puntuales.

Al contrario de lo que sucede con los tumores en adultos, que surgen a partir de acumular un elevado número de mutaciones a lo largo del tiempo, los tumores pediátricos rara vez presentan mutaciones en más de uno o dos oncogenes^{20,21}. En el caso del neuroblastoma, estos oncogenes vienen representados principalmente por MYCN y, en raras ocasiones, por la quinasa de linfoma anaplásico (*anaplastic lymphoma kinase*, ALK); la presencia de uno o ambos está asociada al mal pronóstico de la enfermedad.

Clásicamente, los tumores que presentan un alto número de mutaciones tienen muchas posibilidades de expresar epítomos de membrana que sean reconocidos como extraños por parte del sistema inmune y desencadenar una respuesta antitumoral. La mayoría de estos epítomos surgen a partir de un tipo de mutaciones denominadas “variantes de un único nucleótido” (*single nucleotide variants*, SNVs)²², es decir, aquellas cuya alteración de un único nucleótido en el marco de lectura del gen produce una proteína aberrante. Cada uno de estos epítomos puede convertirse en un antígeno tumoral si es procesado y presentado en las moléculas HLA de las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T reconocen dichos neoepítomos tumorales a través de sus receptores de célula T (*T cell receptors*, TCRs). El resultado de esta sinapsis inmune es la expansión clonal de linfocitos antitumorales específicos de ese antígeno²³. Los tumores con un alto número de mutaciones y de epítomos suelen infiltrarse de una mayor variabilidad clonal de TCRs, y por tanto de presentar mayor respuesta antitumoral.

1.1.4.2.- El microambiente inmune tumoral.

El estroma o microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME) se ve modificado por todos los elementos que lo componen: células linfocitarias, células mieloides, células estromales, y todos los mediadores moleculares que secretan todos estos tipos celulares y que interactúan entre sí polarizando las distintas células hacia distintos fenotipos^{24,25}. El TME es, en última instancia, el responsable del crecimiento tumoral, de su invasividad, del escape inmune

por parte del tumor y de la resolución clínica del mismo. La interacción de todos los elementos que componen el TME determina, por tanto, la resolución clínica del tumor.

El componente inmune o leucocitario infiltrante del tumor (*tumor infiltrating leukocytes*, TILeUs) se compone de muchos tipos celulares diferentes²⁶. A lo largo de los últimos años, han sido numerosos los grupos que han identificado las funciones y/o comportamientos de los distintos tipos celulares inmunes en el microambiente tumoral. Por ejemplo, dentro de todos los leucocitos que pueden infiltrar el tejido tumoral, el componente linfocitario se ha establecido como factor pronóstico favorable en varios tipos tumorales^{27–29}, mientras que el conjunto de células mieloides se suele asociar a estados de inmunosupresión y progresión de la enfermedad^{27,30,31} (no obstante, estas generalidades no se cumplen siempre, pues el comportamiento de cada tipo celular depende de su fenotipo y de las interacciones con otros tipos celulares).

Las células mieloides abarcan distintos tipos de células del sistema inmune innato, como son los macrófagos asociados a tumor (*tumor associated macrophages*, TAMs), las células mieloides supresoras (*myeloid derived suppressor cells*, MDSCs) y las células dendríticas (*dendritic cells*, DCs)³². El papel de estos tipos celulares en la progresión del tumor está relacionado con los mediadores moleculares que estas células secretan en el microambiente tumoral y que polarizan y dirigen el comportamiento de las células tumorales³²; sin embargo, como ya se ha mencionado, existen particularidades para cada tipo celular. Por ejemplo, el comportamiento de los TAMs depende de su fenotipo o estado de activación³³; los TAMs que presentan un fenotipo M1 (proinflamatorio) reaccionan a la presencia de interferón gamma (IFN γ) y secretan citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 β (IL-1 β), la interleuquina 12 (IL-12) o el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor*, TNF α)³⁴; por el contrario, los TAMs con fenotipo M2 (antiinflamatorio) se han asociado a estados inmunosupresores y a la secreción de moléculas inmunosupresoras como la interleuquina 10 (IL-10)³⁵, la interleuquina 3 (IL-3)³⁶ o el factor de crecimiento tumoral β (*tumor growth factor β* , TGF- β)³⁷. Por otro lado, las MDSCs son uno de los grupos de células inmunes que más influyen en el estado del microambiente tumoral. Ambos subtipos de MDSCs (monocíticas y granulocíticas) son capaces de presentar propiedades inmunosupresoras contra los linfocitos CD8+ citotóxicos y las células *natural killer* (NKs) mediante la secreción de moléculas inmunosupresoras, incluyendo arginasa 1 (ARG1); óxido nítrico sintasa, (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS); TGF- β , IL-10 e Indoleamina 2,3-dioxygenasa (IDO)³⁸. Las MDSCs también pueden estimular angiogénesis mediante la producción del factor de crecimiento vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF); del factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblastic growth factor*, FGF); y de la metaloproteína 9, MMP-9; entre otros³⁹) y son capaces de promover procesos metastásicos^{31,40}. La presencia de las MDSCs se ha descrito como abundante en diversos tipos de tumores y se ha asociado al pronóstico desfavorable de los mismos^{41–44}. Las DCs son el tercer gran tipo celular englobado dentro de las células mieloides⁴⁵; aunque la función principal de las DCs consiste en reconocer antígenos dañinos y/o tumorales y presentarlos a los linfocitos CD8+ y CD4+ para activarlos y

combatir estos antígenos específicos, se ha demostrado que determinados factores presentes en el microambiente tumoral son capaces de revertir la acción de las DCs promover el escape inmune por parte del tumor⁴⁶. Al igual que ocurre con las MDSCs, los mediadores moleculares VEGF, interleuquina 6 (IL-6) e IL-10, abundantes en el microambiente tumoral, inducen tolerancia inmune en las DCs a través de la vía de STAT3^{46,47}.

El otro gran grupo de células inmunes son los linfocitos, compuestos por linfocitos T (CD4+, CD8+), linfocitos B y células NK. Como ya se ha mencionado, su presencia en el tejido tumoral suele asociarse a un pronóstico clínico favorable²⁷⁻²⁹. Aunque han sido los linfocitos T infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) el grupo celular que más atención ha recibido en los últimos años en lo referente a terapias innovadoras y factor pronóstico, los linfocitos B infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating B lymphocytes*, TIBs) están acaparando cada vez mayor interés, puesto que su presencia también se ha asociado a buen factor pronóstico. Se han identificado distintos subtipos de linfocitos B con distintas funciones (células B *naïve*, células B memoria, células plasmáticas), incluyendo un subtipo de célula B reguladora (Breg) que es capaz de secretar citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 y el TGF- β ^{48,49}, y cuya presencia se ha identificado en distintos tipos de tumores sólidos, en los que promueven crecimiento tumoral y escape inmune⁴⁹. Además de producir anticuerpos contra distintos tipos de antígenos, los linfocitos B también secretan citoquinas proinflamatorias y pueden funcionar como células presentadoras de antígeno (CPAs), contribuyendo a la acción antitumoral⁵⁰. Por lo tanto, el papel de los linfocitos B deberá ser estudiado en mayor profundidad, tal y como se está haciendo con los linfocitos T.

En los últimos años, se está intentando explotar las propiedades antitumorales de los linfocitos T para desarrollar nuevos tratamientos contra el cáncer. La terapia celular adoptiva (TCA) con linfocitos T en cáncer es especialmente eficaz cuando el tumor posee un alto componente inmune y el tumor se considera, por tanto, inmunogénico. Es el caso de algunos tipos de melanomas, en los que la TCA ha demostrado ser una terapia con resultados clínicos favorables, como han venido demostrando los estudios de Rosenberg y su equipo desde hace años⁵¹⁻⁵³, ya que el melanoma es un tumor que se caracteriza por poseer un porcentaje importante de TILs. Las inmunoterapias y terapias adoptivas han ido evolucionando y mejorando con el fin de explotar el componente inmune para luchar contra distintos tipos de tumores, con resultados variables⁵⁴⁻⁵⁸.

No obstante, en lo relativo a este tipo de terapias existen aún muchas dificultades que resolver y mejorar. La principal es que la terapia adoptiva con linfocitos T no es un tratamiento viable en tumores que no presentan un alto grado inmunogénico. Este es el caso del neuroblastoma y otros tumores pediátricos cuyo mal pronóstico se asocia, en muchas ocasiones, a la falta de componente inmune activo en el estroma tumoral^{20,21,59}.

Hacer que el ambiente tumoral se vuelva más activo inmunológicamente puede ser clave para el éxito de terapias alternativas asociadas a este tipo de tumores. En neuroblastoma, la

presencia de un mayor número de TILs identificados por histopatología se asoció a aquellos pacientes que habían presentado mejor pronóstico, incluso en aquellos en los que se detectó la amplificación de MYCN⁶⁰.

1.1.4.3.- Inmunoterapia en neuroblastoma.

La inmunoterapia en neuroblastoma es un campo cada vez más en auge. El neuroblastoma (y en general todos los tumores sólidos infantiles) se caracteriza por no presentar un gran número de antígenos de membrana potencialmente reconocibles por el sistema inmune, lo que limita el posible uso de inmunoterapias. Los neuroblastomas se caracterizan por expresar una cantidad notable del gangliósido GD2 en la superficie celular⁶¹, y por ello, la terapia anti-GD2 es prácticamente la única inmunoterapia que se utiliza regularmente en el tratamiento del neuroblastoma, aunque su eficacia no se considera especialmente alta. En la actualidad, se está desarrollando una inmunoterapia alternativa consistente en receptores antigénicos quiméricos (*chimeric antigen receptors*, CAR) contra el antígeno GD2^{62,63}. Los primeros resultados en ensayos clínicos de fase I han mostrado resultados prometedores en pacientes con neuroblastoma, con respuestas clínicas que incluyen regresión, estabilización o necrosis de la masa primaria en algunos de los pacientes^{62,64}. Sin embargo, en pacientes con un infiltrado considerable de células mieloides supresoras en la masa tumoral, no existe efecto de esta inmunoterapia⁶⁵; es más, la infiltración de células mieloides establece un microambiente inmunosupresor en el neuroblastoma, representado sobre todo por macrófagos de tipo M2 y células mieloides CD11b+⁶⁶. Asimismo, los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo que no presentan amplificación de MYCN poseen un perfil inflamatorio que facilita la resistencia a drogas y la evasión del sistema inmune^{67,68}, con lo que la terapia anti GD2 tampoco es efectiva.

Por tanto, es necesario encontrar nuevas estrategias terapéuticas para tratar los neuroblastomas del alto riesgo y mejorar el pronóstico clínico de estos pacientes.

1.2 – Viroterapia oncolítica como inmunoterapia

1.2.1.- Principio de la viroterapia oncolítica.

Otra alternativa terapéutica para los tumores sólidos que se ha consolidado en la última década es el uso de virus con capacidad oncolítica selectiva contra las células tumorales, dejando a las células sanas intactas⁶⁹. La estrategia de utilizar virus como tratamiento contra tumores no es nueva, ya que se han reportado casos de regresión tumoral tras una infección viral espontánea en muchas ocasiones y contra diferentes tipos de tumores⁷⁰⁻⁷⁴. El efecto terapéutico de los virus como agentes antitumorales obedece a varios factores: 1) la actividad oncolítica de los virus en las células tumorales tiene un efecto exponencial, ya que cuando una célula tumoral se infecta, el virus es capaz de replicar en ella hasta producir la lisis de la célula, y los nuevos

virus liberados en el entorno tumoral infectarán nuevas células; 2) la lisis de la célula tumoral libera al microambiente moléculas que son potencialmente reconocidas como dañinas, conocidas como *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), con la consecuente acción del sistema inmune contra ellas; 3) las células tumorales infectadas pueden expresar nuevos antígenos, lo que puede reactivar al sistema inmune que se encontraba inactivo en el microambiente tumoral o reclutar nuevas células inmunes. Alternativamente, se están desarrollando virus oncolíticos diseñados para expresar determinadas proteínas que aumenten la respuesta inmune contra ellos. En todos los casos, la inflamación derivada de la infección viral (y su consecuente oncolisis) actúa como un verdadero agente terapéutico debido a la activación del sistema inmune innato y adaptativo contra el tumor.

1.2.2.- Tipos de virus oncolíticos y ensayos clínicos.

No obstante, cabe destacar que cualquier virus no es eficaz contra cualquier tumor. Se ha comprobado la eficacia oncolítica de varios tipos de virus contra tipos tumorales concretos, pero los que tienen más relevancia en el contexto de la clínica y cuyo uso es más habitual son los siguientes:

- **Adenovirus (Ad).** La principal característica de los adenovirus es que éstos son capaces de infectar tanto células que se encuentran en división activa como aquellas que se encuentran en reposo. La mayor parte de los serotipos conocidos de adenovirus (incluyendo el serotipo 5, Ad5, que es el de uso más común) utilizan el receptor Cocksackie-Ad para penetrar en las células; este receptor tiene una alta presencia en células epiteliales pero no en células tumorales^{75,76}. Por ello, a lo largo de los últimos años se han empleado varias estrategias de modificación de los adenovirus que permitan hacerlos más selectivos contra las células tumorales. Una de las más utilizadas es la adición de la secuencia RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) en la base pentónica, que permite la entrada del virus a través de integrinas⁷⁷. Otra de las estrategias más utilizadas consiste en modificar genéticamente el adenovirus eliminando la posición 24 ($\Delta 24$) del sitio de unión de la proteína de la región temprana E1A (*early region 1A*) a retinoblastoma (Rb); esta modificación confiere gran selectividad contra las células tumorales, puesto que la vía del retinoblastoma se altera en casi todos los cánceres humanos en fases avanzadas y los adenovirus mostrarán preferencia contra este tipo de células en comparación con células sanas con la vía del retinoblastoma intacta⁷⁸. En la actualidad, se sigue trabajando en mejoras que aumenten la eficacia y selectividad de los adenovirus como agentes oncolíticos. En la presente tesis doctoral se describe el uso del adenovirus ICOVIR-5, derivado del adenovirus salvaje de serotipo 5 (Ad5), como agente terapéutico contra el neuroblastoma (véase más adelante)^{79,80}.

- **Herpes virus (HSV).** Es uno de los virus oncolíticos más ampliamente utilizados, ya que se ha empleado contra tumores cerebrales y melanoma, así como algunos tumores sólidos infantiles, entre los que se encuentra el neuroblastoma⁸¹. La FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado el uso clínico del T-VEC (*Talimogene laherparepvec*; nombre comercial: IMLYGIC), un herpes virus de tipo I modificado para presentar tropismo por células tumorales⁸²⁻⁸⁴. Esto supone un avance a la hora de defender la viroterapia oncolítica en la clínica.
- **Reovirus.** En estudios preclínicos, los reovirus han demostrado eficacia contra tumores pediátricos, especialmente en meduloblastoma⁸⁵ y en varios tipos de sarcomas (rabdomyosarcoma, osteosarcoma y sarcoma de Ewing)⁸⁶.
- **Vaccinia virus (VV).** Conocido fundamentalmente por su papel como vacuna contra el virus de la viruela, en los últimos años también se ha atenuado para usarlo como virus oncolítico. Estos virus han sido modificados para eliminar las dos copias del gen de la timidina quinasa, lo que les aporta selectividad hacia las células tumorales sobre las sanas⁸⁷.
- **Otros virus utilizados en viroterapia oncolítica son:** el virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la estomatitis vesicular, el virus del valle del Séneca, etc⁸⁸.

A lo largo de la última década, los ensayos clínicos que incluyen virus oncolítico como agentes terapéuticos se han multiplicado, y actualmente existen varios ensayos clínicos finalizados o abiertos evaluando la eficacia de estos tratamientos⁸⁹. En el año 2017, estaban registrados (clinicaltrials.gov)⁹⁰ un total de 77 ensayos clínicos que incluían como agente terapéutico un virus oncolítico⁹¹. En el momento de escribir esta tesis doctoral (septiembre de 2019), existen un total de 94 ensayos que utilizan virus oncolíticos como terapia (clinicaltrials.gov)⁹².

1.2.3.- Estrategias de aplicación de la viroterapia oncolítica.

Una de las limitaciones a resolver en la viroterapia oncolítica es hacer que el virus alcance las regiones tumorales sin provocar toxicidad asociada ni dañar al paciente. La mayoría de los tratamientos oncolíticos se aplican directamente en el propio tumor, como ocurre en los casos de melanoma o de tumores cerebrales (estos últimos, en el momento de la cirugía); esto sólo es posible en el caso de que el tumor sea fácilmente localizable y/o no esté diseminado.

Cuando el tumor se encuentra en un lugar inaccesible por intervención directa, o existen metástasis cuya localización no está identificada con seguridad, la forma más común de administrar viroterapia oncolítica es por vía sistémica, ya que el sistema vascular llega a todas las masas y metástasis tumorales del organismo. En estos casos, la eficacia del tratamiento se ve comprometida por dos grandes factores: el primero, que la dosis administrada con el fin de

asegurar una respuesta clínica nunca puede superar unos niveles que sean tóxicos para el paciente; y segundo, que, administrado por vía sistémica, el virus tiene muchas posibilidades de ser neutralizado por el sistema inmune del paciente, especialmente por macrófagos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, que a su vez orquestarán una respuesta inmune antiviral por parte de los linfocitos T⁹³. De esta manera, el virus oncolítico no podrá ejercer su función inmunomoduladora y oncolítica en el microambiente tumoral, porque será eliminado antes de alcanzar su objetivo. En general, el primer factor se afronta en clínica durante la Fase I de los ensayos, en la cual se busca una dosis máxima tolerada (*maximum tolerated dose*, MTD), de manera que los pacientes puedan soportar efectos secundarios muy leves (que incluyen fiebre, malestar y elevación de las transaminasas hepáticas) tanto si se administran por vía sistémica como si se administran de manera local. El segundo factor, sin embargo, es bastante común, ya que la única manera de sobreponerse a la neutralización del virus por parte del sistema inmune sería administrar dosis tan elevadas de virus que no serían bien toleradas por el paciente. Además, la administración repetida se sigue de desarrollo de memoria inmune que disminuye de manera importante el efecto. Por lo tanto, aunque la viroterapia ha demostrado su seguridad en los pacientes, aún queda mucho por mejorar en cuanto a su distribución en el organismo⁹⁴.

Una manera de superar este problema es utilizar vectores del virus por vía sistémica. Si el virus oncolítico se administra oculto al sistema inmune, en el interior de un vector o transportador, su distribución por vía sistémica no se verá tan comprometida. En los últimos años, la administración por vía sistémica de los virus oncolíticos está ganando fuerza, y ya existen estudios de su distribución vía nanopartículas, vesículas o moléculas especialmente fabricadas para este fin⁹⁵⁻⁹⁸. Sin embargo, la mayor parte de los vectores que se utilizan son células que actúan como un caballo de Troya⁹¹. El tipo celular escogido para ejercer esta función varía dependiendo del grupo de investigación que lo desarrolle, el virus oncolítico que se utilice y el tipo de tumor que se trate. Las células de uso más extendido en investigación preclínica, con independencia de su procedencia, son las células troncales mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*)⁹⁹⁻¹⁰², pero también se utilizan células neurales¹⁰³, linfocitos T cuyos receptores antigénicos han sido modificados (*CAR T cells*)¹⁰⁴, monocitos¹⁰⁵, células dendríticas¹⁰⁶, e incluso las propias células tumorales aisladas¹⁰⁷.

1.3 – *Celyvir*: la combinación de MSC autólogas y del adenovirus oncolítico ICOVIR-5

La necesidad de buscar nuevas terapias alternativas y personalizadas para los neuroblastomas (y otros tumores sólidos infantiles) de alto riesgo que presenten resistencia a dos o más líneas de tratamiento impulsó a nuestro grupo a buscar opciones terapéuticas para

esos pacientes a los que la clínica convencional no ofrecía ninguna solución. La viroterapia oncolítica parecía ser una buena alternativa en estos casos.

Celyvir es el acrónimo de “células y virus”, ya que el medicamento se compone de dos elementos fundamentales: por un lado, las células mesenquimales del propio paciente (células autólogas), y por otro, del adenovirus oncolítico ICOVIR-5.

1.3.1.- El adenovirus oncolítico ICOVIR-5.

El adenovirus oncolítico ICOVIR-5 fue desarrollado y descrito por el Dr. Ramón Alemany y colaboradores en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)^{80,108,109}. ICOVIR-5 (HAd5-DM-E2F-K-Δ24-RGD) es un virus oncolítico derivado del adenovirus humano de serotipo 5 (HAd5) que cuenta con varias modificaciones genéticas para asegurar su mecanismo de acción contra las células tumorales dejando intactos los tejidos sanos (**Figura 1**):

- 1) Sustitución de parte del promotor endógeno de E1A por el promotor E2F-1 para controlar la expresión de la proteína viral E1A.
- 2) Inserción de una secuencia terminal invertida, ITR (*Inverted Terminal Repeat Sequences*), que actúa como “aislante”, precediendo al promotor y que impide la influencia de las secuencias reguladoras próximas.
- 3) Inserción de secuencia Kozak en el codón de inicio de E1A.
- 4) Deleción de 8 aminoácidos (Δ24) en el dominio de unión de E1A con la proteína del retinoblastoma fosforilada (pRb).
- 5) Inserción del tripéptido RGD en la fibra viral, lo que incrementa la eficacia de infección del adenovirus por las células tumorales, ya que éstas sobreexpresan integrinas.

El principal mecanismo que Alemany y su equipo utilizan para diseñar sus adenovirus oncolíticos es servirse de la desregulación que las células tumorales presentan en la vía del retinoblastoma (*Rb pathway*). La fosforilación pRb provoca que éste se disocie del promotor E2F, lo que a su vez dispara el ciclo y la división celular. En células sanas, pRb permanece unido a E2F en condiciones normales y sólo se fosforila y disocia en momentos puntuales. En cambio, células de cáncer en estadios avanzados presentan fosforilación anómala de pRb y por tanto una desregulación de la vía de retinoblastoma que provoca que estén en constante proceso de división celular. El conjunto de alteraciones incluidas en el genoma de ICOVIR-5 consiguen que la replicación del virus quede restringida a células tumorales (con niveles de E2F-1 altos).

1.3.2.- Células mesenquimales autólogas de pacientes.

En nuestra propia experiencia, las MSCs autólogas de los pacientes constituían un buen vector de transmisión del adenovirus oncolítico, ya que las MSCs cuentan con unas propiedades que las hacen especialmente atractivas a la hora de actuar como transportadores:

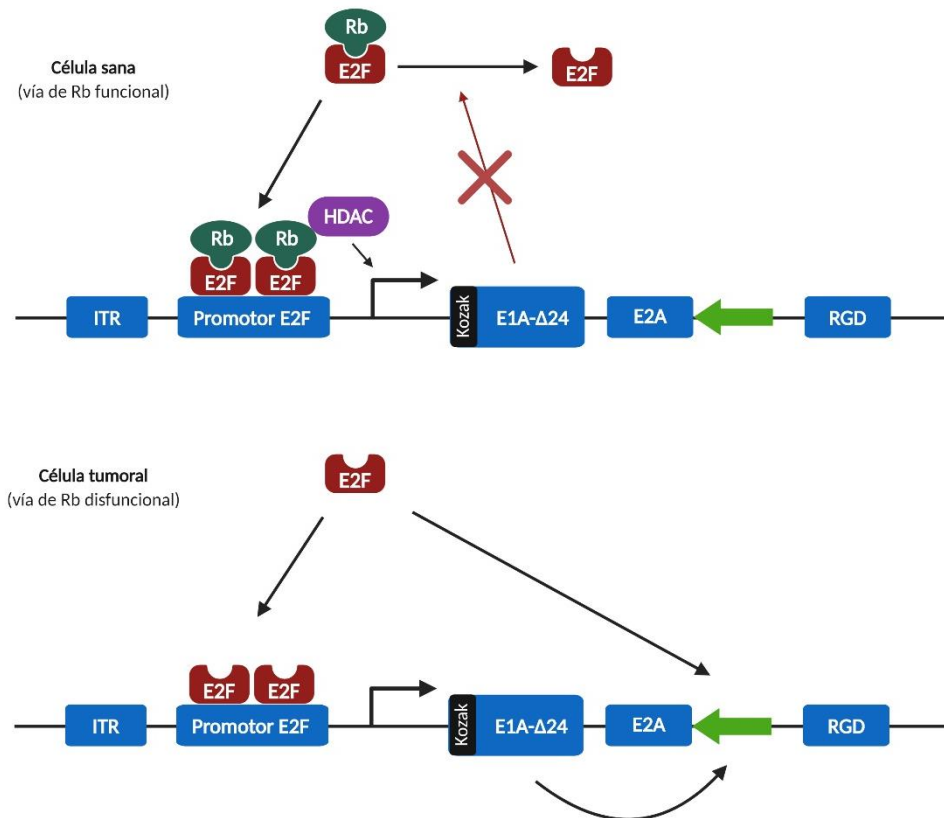


Figura 1: Esquema del mecanismo de acción del adenovirus oncolítico ICOVIR-5 (adaptada de Cascallo et al., 2007) en células normales y en células tumorales. Cuando la ruta de Rb está desregulada y el factor transcripcional E2F queda libre, se promueve el inicio del ciclo y la división celular, algo característico en células tumorales. ICOVIR-5 porta en su genoma la región E1A para favorecer su propia replicación bajo estas condiciones. (Imagen creada con Biorender.com.)

- 1) Las MSCs son capaces de migrar hacia lugares donde existe inflamación y señalización por daño tisular gracias a los numerosos receptores que poseen en la membrana y que participan en ejes de señalización por quimioquinas; de estos ejes, el conformado por CXCR4/CXCL12¹¹⁰, o aquellos en los que intervienen los factores como VEGF α , TGF- β o IL-6 (factores clásicos asociados a inflamación)¹¹¹, son los más importantes para la actividad migratoria de las MSCs. Otras moléculas que también intervienen en la capacidad de anidación (*homing*) de las MSCs son CCR1, CCR4, CCR7, CCL2 o CXCR5¹¹¹⁻¹¹³. Estas hipótesis fueron confirmadas por nuestro grupo en el año 2016, en el que demostramos que la presencia de ciertos receptores de membrana en las MSCs eran un factor diferencial en las MSCs de los pacientes que habían respondido favorablemente a la terapia¹¹⁴.
- 2) Las MSCs han demostrado su capacidad inmunomoduladora y de interacción con las células del sistema inmune¹¹⁵. Su papel se considera dual, pues dependiendo del inmunofenotipo que presente la MSC (M1 o M2), ésta interactúa con el sistema inmune

produciendo inflamación o inmunosupresión, respectivamente. Se ha visto también que las MSCs son capaces de secretar factores como IDO, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico, y prostaglandina E2 (PGE2), entre otros¹¹⁶. Esta interacción de las MSC con el sistema inmune puede tener un papel activo en el éxito de la terapia con *Celyvir* y la capacidad de la MSC de evadir el sistema inmune mientras está actuando como transportadora del virus.

La trayectoria de este grupo y trabajos anteriores ya publicados han demostrado la eficacia de *Celyvir* como tratamiento antitumoral en varias ocasiones¹¹⁴. *Celyvir* cuenta con los beneficios de la viroterapia oncolítica por la acción del ICOVIR-5^{108,109}, y además incorpora un elemento fundamental en la estrategia antitumoral: la célula mesenquimal como transportador del virus, seleccionada gracias a las propiedades intrínsecas de la célula mesenquimal (ya mencionadas). *Celyvir* ha probado ser seguro para el paciente y no presentar alta toxicidad¹¹⁷.

1.3.3.- Modelo murino de *Celyvir*.

Con el fin de dilucidar los aspectos claves de la terapia con *Celyvir* en nuestros pacientes, es necesario establecer un modelo murino de la enfermedad con el que analizar todos los cambios que el tratamiento produce tanto en el propio tumor como de manera sistémica. Esto implicaba utilizar no sólo un modelo de neuroblastoma espontáneo (ratón TH-MYCN), sino también un adenovirus oncolítico murino que contuviera modificaciones genéticas similares a las que contiene ICOVIR-5 (el adenovirus oncolítico MAV-1 dIE102) y una célula transportadora (*carrier*) similar, la célula mesenquimal murina (*murine mesenchymal stem cell*, mMSC).

1.3.3.1.- Ratón TH-MYCN

El ratón TH-MYCN es un ratón inmunocompetente que desarrolla espontáneamente un neuroblastoma similar al del humano debido a la presencia en el genoma de sus células neuroectodérmicas del oncogén MYCN, que está presente en 1/3 de los casos de neuroblastoma humano¹¹⁸. En estos animales, el transgén puede presentarse en homocigosis o en heterocigosis. Cuando el ratón presenta una copia del transgén en uno o dos alelos, dicho ratón tiene la capacidad de desarrollar en algún momento de su vida un neuroblastoma espontáneo. En el año 2012, Rasmuson y colaboradores realizaron un estudio intensivo que pretendía describir las características de crecimiento en los TH-MYCN dependiendo de la presencia o ausencia del transgén¹¹⁹. Rasmuson y su equipo determinaron la frecuencia y el tiempo aproximado de desarrollo de tumor en los distintos animales dependiendo de si éstos eran homocigotos o heterocigotos para el transgén. Mientras que los animales homocigotos desarrollan tumor en el 100% de los casos alrededor de la semana 6 de vida, la penetrancia tumoral en el caso de los animales heterocigotos es más variable; Rasmuson y su equipo observaron que alrededor del 50% de los animales heterocigotos desarrollaban neuroblastoma, y que la ventana de tiempo de

generación tumoral era más amplia (entre las 6 y las 18 semanas de vida, siendo la mayor prevalencia alrededor de las 9 semanas).

Los tumores que desarrollan los ratones transgénicos TH-MYCN sobre la región paraspinal han demostrado presentar unas características muy similares a las de los tumores humanos. Cuando Kroesen y colaboradores injertaron células derivadas de tumores TH-MYCN espontáneos sobre la glándula adrenal de ratones isogénicos e inmunocompetentes, observaron que estos tumores crecían con mayor agresividad y manteniendo las características de los neuroblastomas espontáneos humanos en mayor medida que cuando las mismas células se injertaban en zonas subcutáneas de los mismos ratones¹²⁰. El mismo grupo destacó la utilidad de estos ratones para estudiar las células inmunes infiltrantes en estos tumores¹²¹, indicando que al igual que los neuroblastomas humanos, estos tumores presentaban un bajo número de linfocitos T CD8+ relacionado con la falta de moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC I)¹²². Este grupo también observó que el componente mieloide (especialmente los TAMs y las MDSCs) era mayoritario en el infiltrado leucocitario tumoral, y que la fracción linfocitaria estaba mayormente representada por linfocitos T reguladores (Tregs)¹²¹. El componente mieloide, además, presentaba un perfil inmunosupresor, siendo los macrófagos mayormente representados por el fenotipo M2, mientras que las MDSCs monocíticas se han asociado de igual manera a inmunosupresión en diversos tipos de cáncer. En una publicación del año 2013, Carlson y colaboradores definieron con mayor precisión los cambios que se producían a nivel inmune a lo largo del tiempo en los tumores de los ratones TH-MYCN¹²³. Carlson y su equipo determinaron que en los tumores de los TH-MYCN, el componente linfocitario (CD3+) estaba presente en estadios tempranos del desarrollo tumoral (identificados tanto por inmunohistoquímica como por citometría de flujo); a medida que el tumor progresaba en estos animales, el componente linfocitario disminuía y se veía sustituido en abundancia por los macrófagos infiltrantes de tumor (TAMs). Es decir, que el componente inmune adaptativo temprano se veía sustituido por células del componente inmune innato (TAMs, MDSCs y DCs) a medida que el tumor progresaba y el pronóstico empeoraba. Esto sucede también en los tumores de pacientes pediátricos, que presentan una elevada infiltración de TAMs cuanto peor es el pronóstico del paciente (descrito por Asgharzadeh y colaboradores)⁶⁸. Carlson y su equipo también determinaron que los estadios avanzados de los tumores de ratones TH-MYCN se acompañaban de una presencia elevada de citoquinas de tipo T_H2, como pueden ser TGF- β , IL-10 e IL-6, y que se han asociado clásicamente a mecanismos de escape inmune por parte del tumor^{124,125}.

1.3.3.2.- Adenovirus oncolítico murino MAV-1 dIE102.

Uno de los grandes inconvenientes en el estudio de los adenovirus oncolíticos en modelos animales es que poseen alta especificidad por su especie huésped, y por tanto virus derivados de cepas humanas no pueden replicarse con eficacia en células de otros organismos, incluyendo las células murinas (resultado de la coevolución entre virus y células huésped)^{126,127}. Para

nuestro proyecto, utilizamos el adenovirus MAV-1 dIE102 cedido por la Dra. Katherine Spindler, que ha demostrado su capacidad oncolítica en varias líneas tumorales murinas¹²⁸.

Los adenovirus humanos deben parte de su capacidad infectiva a las proteínas derivadas de la región temprana 1A, que son las encargadas de la interacción del virus con diversas proteínas del huésped, necesarias para una infección eficaz por parte del adenovirus¹²⁸. Entre otras funciones, las proteínas derivadas de la región E1A obligan a las células infectadas a entrar en la fase S del ciclo celular¹²⁹; regulan la expresión génica viral^{130,131}; y activan la transcripción de genes tanto de la célula huésped como del propio virus^{130,132}. Por ello, es común potenciar la actividad oncolítica de los adenovirus modificando las regiones constantes (CR) del gen E1A. En el caso de los adenovirus murinos, las regiones son similares a las del humano. Spindler y su equipo diseñaron tres adenovirus oncolíticos murinos modificando tres regiones diferentes del gen E1A para probar las diferentes interacciones y variaciones que estas regiones producían en el proceso de infección¹²⁸. Estas regiones eran CR1, CR2 y CR3. Así, diseñaron los siguientes adenovirus eliminando (deleccionando, Δ) las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones constantes CR1, CR2 y CR3, respectivamente (**Figura 2**):

- MAV-1 dIE105 (CR1 Δ , aa 36-77)
- MAV-2 dIE102 (CR2 Δ , aa 112-128)
- MAV-1 dIE106 (CR3 Δ , aa 136-153)

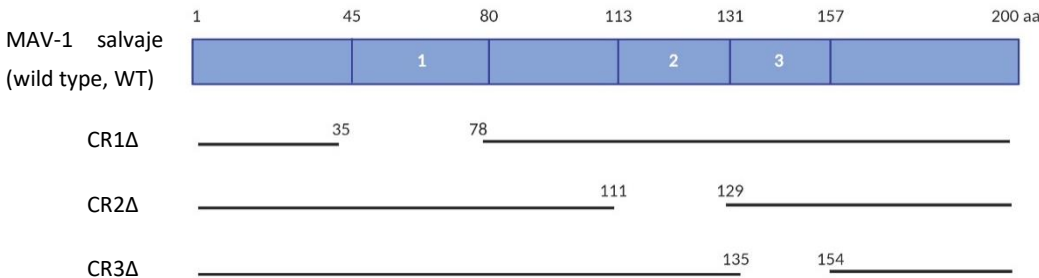


Figura 2: Esquema de la secuencia del adenovirus murino MAV-1 dIE102 y sus modificaciones (adaptada de Smith *et al.*, 1996). (Imagen creada con Biorender.com.)

La región CR2 en el MAV-1 es la más similar a la secuencia equivalente en el adenovirus humano. Por este motivo, escogimos el MAV-1 dIE102 para todos los experimentos relativos al *Celyvir* murino.

1.3.3.3.- Células mesenquimales murinas.

Nuestro objetivo a la hora de desarrollar el modelo murino de *Celyvir* es que el sistema completo (enfermedad y medicamento) perteneciera completamente al ratón. Por ello, buscamos la manera de aislar y amplificar células mesenquimales murinas en las que el

adenovirus murino pudiera replicar y que compartieran las propiedades de las MSCs humanas que las hacían idóneas para la terapia.

Al igual que ocurre con las MSCs en el humano, las mMSCs pueden proceder de distintas fuentes y tejidos, entre las que se encuentran la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental o el cordón umbilical^{133,134}. No obstante, la obtención y el rendimiento de las mMSCs suele ser significativamente menor cuando se comparan a las MSCs humanas, y las fuentes de obtención de mMSCs son normalmente la médula ósea y el tejido adiposo¹³⁵. Las mMSCs son un raro ejemplo de tipo celular mejor caracterizado en humanos que en ratones, y aún hoy se siguen optimizando ensayos para su obtención, proliferación e identificación^{136–138}.

En nuestra experiencia, las mMSCs fueron obtenidas a partir del tejido adiposo de ratones congénicos al ratón TH-MYCN y cultivadas en condiciones estándar (descrito en la sección Material y Métodos). Las mMSCs conservaban su capacidad de adherencia al plástico, de división celular y sus marcadores característicos de membrana (que son diferentes de los que presentan las MSCs humanas).



2. – OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es contribuir a optimizar el medicamento *Celyvir* para su uso en pacientes, desde el estudio de:

1. Identificación de marcadores y/o procesos biológicos en el medicamento que se relacionen con el resultado clínico de la terapia.
2. Caracterización del proceso de respuesta, adaptación y escape del control ejercido por esta terapia en los pacientes.
3. Un modelo de neuroblastoma murino capaz de mimetizar la situación clínica de los pacientes pediátricos tratados con *Celyvir*.

3. – MATERIALES Y

 **MÉTODOS**

3.1 – Características biológicas de *Celyvir* asociadas a respuesta clínica.

3.1.1 – Obtención de las células mesenquimales de pacientes.

Las MSCs se obtuvieron a partir de aspirado de medula ósea de la cresta iliaca de los pacientes. Las células mononucleadas se obtuvieron a partir de un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare) por centrifugación a 1500 rpm, 20 minutos, 20°C. La capa de células mononucleares obtenidas tras la centrifugación se aisló del resto de los componentes del gradiente con ayuda de una pipeta Pasteur. Las células se transfirieron a un tubo Falcon limpio y se lavaron con PBS (*phosphate buffered saline*, Gibco). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, las células mononucleadas se resuspendieron en medio de cultivo.

3.1.2 – Cultivo de las células mesenquimales de pacientes.

La fracción mononucleada inicial se cultivó a una densidad de 500.000 células / cm² de superficie con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1g/L glucosa, Gibco, Carlsbad, CA), suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS, HyClone, Logan, UT) previamente inactivado en un baño húmedo durante 20 min a 56°C, y 1% penicilina–estreptomicina (P/S, Gibco). El medio de cultivo se reemplazó 48 horas después, tiempo suficiente para que las MSCs se adhirieran al plástico mientras que el resto de células mononucleadas permanecían en suspensión en el medio de cultivo. Después de este primer cambio, el medio se reemplazaba cada 3-5 días.

Las MSCs se mantuvieron en una atmosfera a 37°C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron el nivel adecuado de confluencia (aproximadamente un 80%). En el momento de la tripsinización las células se lavaban una vez con PBS y después se les añadía la tripsina (TripLE Express, Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células desprendidas de la superficie plástica se recogían con ayuda de medio de cultivo fresco y una pipeta, y se centrifugaban a 1500 rpm durante 5 minutos para retirar la tripsina. El botón celular (*pellet*) de MSCs obtenido se resuspendía en medio de cultivo fresco, y las células volvían a sembrarse a 3000-5000 células / cm².

En el tercer o cuarto pase celular, se procedía a caracterizar las MSCs por citometría de flujo.

3.1.3 – El adenovirus oncolítico ICOVIR-5.

Las características de ICOVIR-5 han sido descritas por sus autores^{80,108,109}. Para este trabajo, su producción se realizó en la Unidad de Producción de Vectores de la Universidad de Barcelona.

3.1.4 – Preparación de Celyvir.

La preparación del medicamento para uso humano cumpliendo con las normas de correcta fabricación (NCF, en inglés *Good Manufacture Practice, GMP*) y su administración a los pacientes ha sido ya descrita por nuestro equipo. Un esquema del proceso se puede ver en la **Figura 3**:

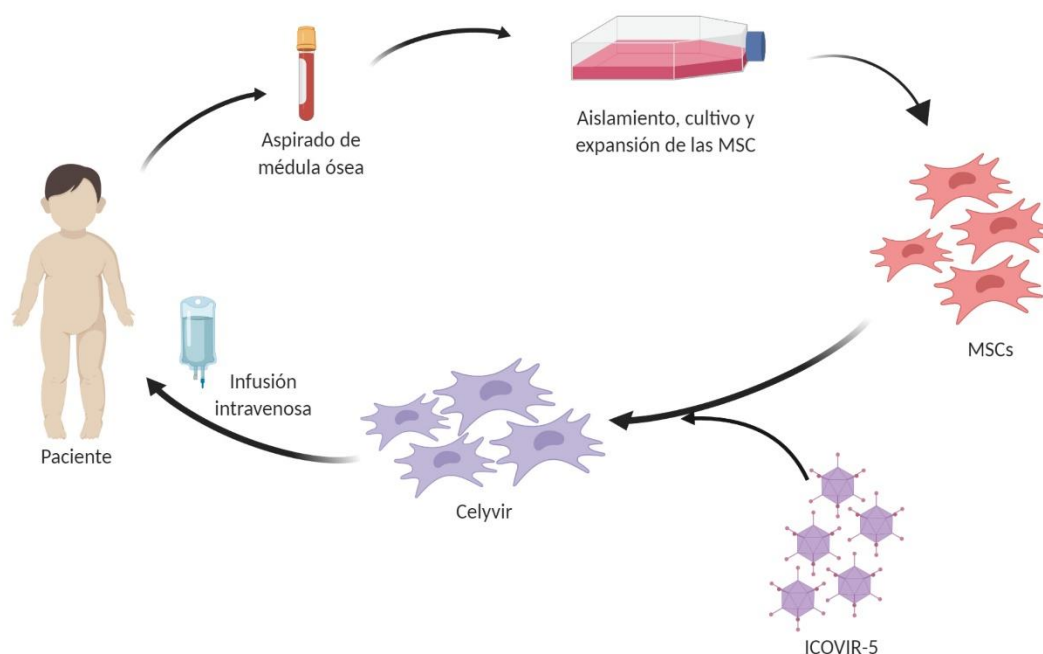


Figura 3: Esquema del procedimiento de la administración de *Celyvir* en los pacientes. (Imagen creada con Biorender.com.)

Cuando la producción de *Celyvir* durante esta tesis doctoral no tenía por finalidad su uso en pacientes, todos los procesos se hicieron en un laboratorio de bioseguridad 2 con todas las medidas de seguridad pertinentes, pero no bajo condiciones GMP. Brevemente, las MSCs de estos pacientes se descongelaron y se sembraron en condiciones de esterilidad. Posteriormente las MSCs se expandieron en número hasta que la densidad celular permitía fabricar el producto *Celyvir*. Las MSCs entonces se tripsinizaron y se irradiaron a una intensidad de 30 Gy. Posteriormente las MSCs se infectaron con ICOVIR-5 durante 2 horas y se volvieron a poner en cultivo durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se tomaron los dos elementos principales del cultivo por separado para realizar dos técnicas distintas: por un lado, el sobrenadante del cultivo celular para realizar el análisis de las proteínas excretadas por las células al medio a las 24 horas tras la infección; y por otro, la propia fracción celular para analizar el transcriptoma completo de cada uno de los pacientes (detallado en el apartado siguiente).

3.1.5 – Generación del secretoma de Celyvir (Protein Profiling Service).

Para llevar a cabo el estudio de proteómica del producto *Celyvir*, se escogieron ocho pacientes pertenecientes al programa de uso compasivo de *Celyvir*. Cuatro de ellos habían presentado algún tipo de respuesta clínica debido al tratamiento (respuesta completa, respuesta parcial o estabilización), mientras que cuatro de ellos no habían presentado ningún tipo de mejoría debido al mismo. Dichos pacientes se detallan a continuación:

USO COMPASIVO CELYVIR	
RESPUESTA	NO RESPUESTA
NBL268	NBL687
NBL283	NBL356
499231	NBL284
NBL363	NBL314

Se fabricó *Celyvir* según lo ya explicado y se recogió el sobrenadante del cultivo celular para realizar el análisis de las proteínas excretadas por las células al medio a las 24 horas tras la infección. El análisis del sobrenadante del cultivo y el estudio del proteasoma se subcontrató a la empresa Tebu-Bio. Los detalles del procedimiento se recogen en el Anexo 1. Los resultados crudos obtenidos se utilizaron para el análisis estadístico posterior. (El análisis estadístico empleado para ello se detalla en el punto 3.1.7.).

3.1.6 – Estudio del transcriptoma de Celyvir (RNA sequencing).

Para el estudio del transcriptoma se utilizó la fracción celular de los cultivos de *Celyvir* de los que también se sacaron los sobrenadantes. El ácido ribonucleico (ARN) se extrajo con el kit Absolutely RNA Microprep Kit (Agilent, Santa Clara, CA) y cada muestra se trató con ADNasa para evitar contaminación de ADN. Se enviaron 3 µg de ARN de cada muestra a la Unidad de Secuenciación Masiva (*next generation sequencing*, NGS) del Parque Científico de Madrid en donde se realizó la secuenciación masiva. Los resultados crudos obtenidos se utilizaron para el análisis estadístico posterior. (El análisis estadístico empleado para ello se detalla en el punto 3.1.7.).

3.1.7 – Análisis estadístico.

El análisis de los datos masivos obtenidos del estudio del secretoma y del transcriptoma se realizó en colaboración con la empresa Anaxomics. Los detalles de los procedimientos y criterios empleados se recogen en el Anexo 2.

3.1.8 – Validación de los resultados obtenidos en los análisis de transcriptoma y el secretoma de las células mesenquimales de los pacientes.

3.1.8.1 – Validación de los resultados del transcriptoma por PCR cuantitativa.

Para validar los genes candidatos identificados por los análisis bioinformáticos, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR) cuantitativa (qPCR) utilizando la tecnología TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) en muestras de *Celyvir* de una cohorte de pacientes independiente de la cohorte inicial, utilizada durante el proceso de identificación (respondedores, n=5; no respondedores, n=10). Se utilizaron los siguientes ensayos de Applied Biosystems:

Gen	Sinónimo	Referencia
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor de TNF	Hs00936781_m1
MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral	Hs00920075_m1
PCBP2	Proteína de unión Poly(RC) 2	Hs01590472_mH
FASN	Sintasa de ácidos grasos	Hs01005622_m1
NDRG1	Proteína 1 reguladora de N-Myc	Hs00608387_m1
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Hs02786624_g1

La reacción de qPCR se lleva a cabo utilizando Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), y la proporción de los elementos para una reacción de qPCR es la siguiente para un volumen final de 20 µL:

<i>TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)</i>	10 µL
<i>TaqMan Gene expression assay (20X)</i>	1 µL
<i>Agua libre de ADNasa</i>	4 µL
<i>cADN</i>	5 µL
VOLUMEN FINAL DE LA REACCIÓN	20 µL

3.1.8.2 – Cuantificación de candidatos del secretoma por Luminex.

Para validar funcionalmente los resultados del transcriptoma identificados por los análisis bioinformáticos anteriores, se cuantificaron los niveles de algunas proteínas en los sobrenadantes de *Celyvir* de una cohorte de pacientes independiente de la cohorte inicial, utilizada durante el proceso de identificación (respondedores, n=5; no respondedores, n=10) con la tecnología Luminex xMAP. Para ello, se utilizaron los siguientes ensayos de la tecnología Luminex xMAP, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- **MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel** (HCYTOMAG-60K, Merck, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) para la medición de interleuquina 4 (IL-4), IL-6, IL-10 y MCP-1 (CCL2).
- **MILLIPLEX MAP Human Soluble Cytokine Receptor Panel** (HSCRMAG-32K, Merck, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) para la medición del receptor de interleuquina 6 (IL-R6).

Las placas se analizaron con el aparato MAGPIX® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) y los resultados se interpretaron utilizando el software xPONENT MAGPIX (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA).

3.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de *Celyvir*.

3.2.1 – Obtención y conservación de las muestras tumorales.

Las muestras frescas de tumor se obtuvieron a partir de cirugía en dos momentos clave del tratamiento: la primera de las muestras correspondía a una primera etapa en que la paciente respondía al tratamiento con *Celyvir* y se mantuvo clínicamente estable (muestra OLD); y la segunda correspondía a un momento posterior en el que clínicamente la paciente dejó de mostrar una respuesta positiva a *Celyvir* y la enfermedad se encontraba en progresión (muestra NEW). Ambas muestras tumorales se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para llevar a cabo el estudio. Como muestra control de tejido sano, se utilizaron células mesenquimales de médula ósea (MO-MSK) de la propia paciente. Estas células se obtuvieron con el fin de amplificarlas para administrar el tratamiento a la paciente, tal como se detalla en el punto 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.4 de esta tesis doctoral.

3.2.2 – Purificación y cuantificación del ADN genómico (ADNg).

Para purificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico (ADNg) de las muestras tumorales (tanto OLD como NEW) y de células sanas, se empleó el kit Qiamp DNA Mini (Qiagen). Como ADN control, se purificó el ADNg procedente las MO-MSK de la paciente utilizando el mismo protocolo. Brevemente, las muestras se digirieron con Proteinasa K y se siguió el procedimiento detallado en el protocolo del kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue. El ADNg se midió utilizando el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). El ADNg purificado total se eluyó en agua libre de ADNasa y se envió a la empresa Sistemas Genómicos S.L. (Valencia) para realizar estudios de secuenciación masiva. Los datos crudos se utilizaron para el estudio bioestadístico que permitió identificar las variaciones genéticas de ambas muestras tumorales,

de neoepítomos tumorales, y repertorio de distintos clones de receptores de células T en las muestras tumorales de la paciente en cada momento de la enfermedad (estabilización y progresión). (Ver Anexo 3 para la descripción del análisis bioinformático.)

3.2.3 – Purificación y cuantificación del ARN de las muestras.

Tanto el tejido tumoral de la muestra OLD como el de la muestra NEW se pulverizaron con ayuda de un homogeneizador (VDI 12, ref# 431-0110, VWR) en buffer RLT con β -mercaptoetanol. Se utilizaron 30 μ g de tejido por cada muestra. La extracción de ARN se realizó con el RNeasy Mini kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Dado que el ARN resultante iba a ser utilizado en tareas de secuenciación, se eliminó el ADN genómico con ayuda de ADNasa. El ARN se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific) a una absorbancia de 260 nm. Se prepararon alícuotas de 5 μ g de ARN total para enviar en un volumen final de 50 μ L de agua libre de ARNasa (concentración final: 100 ng/ μ L). Las muestras de ARN de ambos tumores (OLD y NEW) y de las células control (MO-MSC) se enviaron al parque Científico de Madrid para su secuenciación. Los datos crudos se utilizaron para el estudio bioestadístico que permitió identificar las características de infiltración inmune de ambas muestras tumorales, la expresión de neoepítomos tumorales y componentes de la presentación antigénica de los mismos. (Ver Anexo 4 para la descripción del análisis bioinformático.)

3.2.4 – Análisis bioinformático.

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron en colaboración con la Unidad de Biomarcadores y Susceptibilidad (ICO-Idibell). En el Anexo 3 y el Anexo 4 se describen los detalles de los procedimientos y criterios empleados para el análisis del WES y del RNA-Seq, respectivamente.

3.2.5 – Análisis del microambiente tumoral de la paciente por PCR cuantitativa.

La extracción del ARN se llevó a cabo utilizando el mismo método que el descrito en el punto 3.2.3. Para las reacciones de qPCR, se utilizó el sistema de sondas TaqMan (TaqMan Gene expression assays, Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) con los ensayos que se detallan a continuación:

Gen	Sinónimo	Referencia
HAVCR2 (TIM3)	Receptor celular 2 para el virus de la hepatitis A	Hs00958618_m1
HMGB1	High mobility group box 1	Hs01923466_g1
CEACAM1	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1	Hs05041713_s1
LAG3	Gen de activación de linfocitos 3	Hs00958444_g1
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR	Hs00219575_m1
CLEC4G (LSEctin)	Dominio lectina tipo C (familia 4, miembro G)	Hs00962163_g1
PDCD1 (PD1)	Receptor de muerte celular programada 1	Hs01550088_m1
CD274 (PDL1)	Ligando 1 de muerte programada	Hs00204257_m1
CD273 (PDL2)	Ligando 2 de muerte programada	Hs00228839_m1
TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1	Hs00998133_m1
TGFB2	Factor de crecimiento transformante beta 2	Hs00234244_m1
TGFB3	Factor de crecimiento transformante beta 3	Hs01086000_m1
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Hs02786624_g1

3.3 – Modelo murino de *Celyvir*.

3.3.1 – Ratones TH-MYCN.

Los ratones utilizados para este trabajo son los pertenecientes a la cepa TH-MYCN, desarrollada por Weiss y colaboradores¹¹⁸ en el fondo genético 129/SvJ. Estos ratones tienen la capacidad de desarrollar neuroblastoma espontáneamente a partir de células de origen neuroectodérmico gracias a la expresión del oncogén humano MYCN, que se activa bajo el promotor tirosina hidroxilasa (TH) de la rata¹³⁹, que es el gen activo durante la migración de las células de la cresta neural en etapas tempranas del desarrollo.

3.3.1.1 – Gestión de la colonia.

En nuestro modelo experimental, la idea original era utilizar los animales homocigotos para el transgén para realizar nuestro estudio. En un primer momento se compraron tres parejas reproductoras compuestas por un macho homocigoto para el transgén (TG/TG) y una hembra heterocigota para el transgén (TG/-).

		Macho	
		Alelo TG	Alelo TG
Hembra	Alelo WT	Cría TG (+/-) (25%)	Cría TG (+/-) (25%)
	Alelo TG	Cría TG (+/+) (25%)	Cría TG (+/+) (25%)

Sin embargo, debido a la prevalencia del tumor, la ventana de tratamiento en los animales homocigotos es prácticamente nula, por lo que para ese trabajo se decidió utilizar a los animales heterocigotos.

Para ello, se dispusieron tres cruces reproductores compuestos por un macho TH-MYCN heterocigoto (transgénico, TG) y dos hembras 129/SvJ salvajes (*wild type*, WT) cada uno. Estos cruces fueron ampliando paulatinamente en número a lo largo del estudio hasta alcanzar un número de ocho cruces totales, para asegurar el número de crías necesario para la experimentación.

La empresa Vivotecnia se encargó de suministrar y mantener a los animales reproductores, así como mantener las crías hasta que éstas alcanzaban la edad del destete y por tanto se podía empezar a trabajar con ellas. También se encargaban de la obtención y envío de muestras de cada una de las crías para poder hacer el genotipo.

3.3.1.2 – Genotipado.

Para identificar qué animales de cada camada nacida pertenecían a genotipo WT o genotipo TG, el personal de Vivotecnia se encargaba de marcar e identificar cada una de las crías. En ese mismo momento, también se cortaba una pequeña parte de la cola de la cría, que se identificaba y se enviaba a nuestro laboratorio para su correcto genotipado.

3.3.1.2.1 – Extracción de ADN.

El ADN de los fragmentos de cola se extrajo utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Este kit se basa en la digestión del tejido con proteinasa K y permite extraer el ADN genómico total de una muestra con un gran rendimiento gracias al sistema de columnas que permite que el ADN quede retenido en la membrana hasta el momento de la elución, desechando con ayuda de los buffers apropiados y los sucesivos lavados otros contaminantes (ARN y proteínas).

En nuestro caso, la cola de los ratones se resuspendía en 180 µL de buffer ATL y después se le añadían 20 µL de proteinasa K. Las colas en esta suspensión se incubaban durante unas 2 horas (o hasta que el tejido estuviese disuelto) a 56°C, preferiblemente en agitación, gracias a un agitador. Después, el ADN se retenía en la membrana de la columna y se purificaba con sucesivos lavados con los *buffers* apropiados. En el paso final, el ADN se eluye con buffer AE o agua en un volumen final de 150 µL.

3.3.1.2.2 – Cebadores de la reacción

Se siguió el protocolo publicado por Haraguchi y Nakagawara¹⁴⁰, usando cebadores (*primers*) que identifican y amplifican regiones alélicas correspondientes al

transgén o a su secuencia homóloga en el alelo WT, como se muestra en la **Figura 4** (extraída y adaptada de Haraguchi y Nakagawara, 2009):

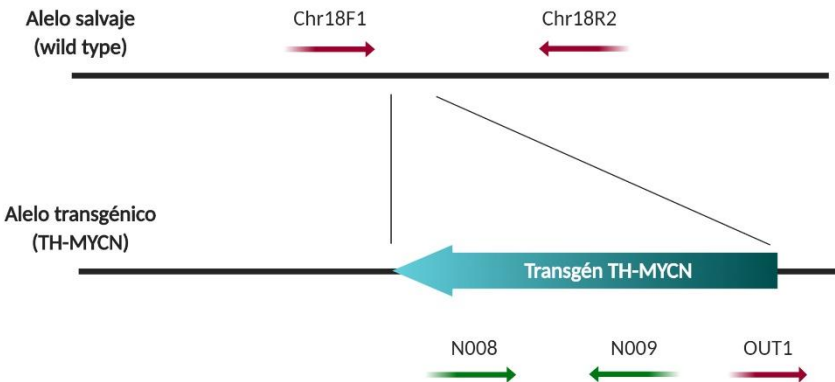


Figura 4: Esquema del alelo salvaje y del alelo transgénico y sus respectivas combinaciones de *primers* para su identificación mediante el genotipado de los animales (extraída y adaptada de Haraguchi y Nakagawara, 2009). (Imagen creada con Biorender.com.)

Para diferenciar ratones WT, ratones heterocigotos y ratones homocigotos utilizamos los siguientes cebadores:

Chr18F1	<i>Forward</i>	5'-ACTAATTCTCCTCTCTGCCAGTATTTGC-3'
Chr18R2	<i>Reverse</i>	5'-TGCCTTATCCAAATATAAATGCCAGCAG-3'
OUT1	<i>Forward</i>	5'-TTGGCACACACAAATGTATATACACAATGG-3'

La combinación Chr18F1 y Chr18R2 sirve para identificar al alelo WT (500 pares de bases, pb), y Chr18R2 y OUT1 identifica el alelo TG (295 pb).

3.3.1.2.3 – Genotipado por PCR convencional

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima ADN polimerasa GoTaq (GoTaq® DNA Polymerase, Promega), los pares de *primers* necesarios para cada reacción de PCR (*forward* y *reverse*) y 2 µL de ADN. El volumen de la reacción de PCR se completaba con 6 µL agua libre de ADNasa (*DNase free water*, Promega) hasta llegar a un volumen final de 20 µL.

<i>GoTaq® DNA Polymerase (2X)</i>	10 µL
<i>Primer (Forward)</i>	1 µL
<i>Primer (Reverse)</i>	1 µL
<i>Agua libre de ADNasa</i>	6 µL
<i>ADN de ratón</i>	2 µL
VOLUMEN FINAL DE LA REACCIÓN	20 µL

Todos los pares de *primers* utilizados en este trabajo amplifican la secuencia diana bajo las siguientes condiciones de PCR:

95 °C	95 °C	58°C	72 ° C
60 segundos	20 segundos	30 segundos	40 segundos

34 ciclos

Los resultados se visualizaban mediante gel de agarosa al 2% (2 g de agarosa por cada 100 mL de TAE 1X).

Con los resultados obtenidos se seleccionaban los animales para los distintos estudios.

3.3.1.3 – Mantenimiento de los animales.

Todos los procedimientos animales fueron llevados a cabo siguiendo la legislación nacional y europea (RD 53/2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para la protección y el uso de animales de experimentación científica, la Ley 6/2013 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio y la Directiva Europea 2010/63/UE para la protección de animales de laboratorio).

La cría y mantenimiento de los animales se llevó a cabo en el Servicio del Animalario del CIEMAT (número de registro ES280790000183). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros Hepa, humedad relativa de $55 \pm 15\%$ y temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con ciclos de luz/oscuridad de 12h, alimentación *ad libitum* con pienso UAR A04 (UAR, Villemoisson-sur-Orge, Francia) y agua acidificada.

3.3.2 – Celyvir murino.

3.3.2.1 – Células mesenquimales murinas

Las mMSCs se obtienen a partir de la grasa de ratones congénicos, de fondo genético 129/SvJ. Se utilizaron 5 ratones de fondo genético 129/SvJ. Los ratones se sacrificaron con anestésico (avertina) por vía intraperitoneal y a continuación se les practicó una incisión en la zona baja del abdomen. El tejido adiposo blanco se retira con cuidado y con ayuda de pinzas, y se lleva a PBS con 1% de P/S en tubos Falcon.

En primer lugar, la grasa se sitúa sobre una placa Petri y se tritura con ayuda de pinzas, bisturíes y/o tijeras hasta que se consigue la consistencia de una papilla. A continuación, la grasa triturada se transfiere a un Falcon de PBS con 1 mg/mL de colagenasa B (Roche). La grasa se incuba a 37°C para favorecer la digestión enzimática durante una hora (o hasta que el tejido esté totalmente disgregado). Por último, se pasa la grasa por un tamiz de 100 micras (μm) para retirar los restos de tejido que la colagenasa no ha podido disgregar. La suspensión celular se

lava dos veces con PBS, y se procede a su conteo celular para sembrar las células en una proporción adecuada (100.000 células vivas / cm²) (**Figura 5**).

Las células se cultivan en la superficie de cultivo adecuada con medio MesenCult (STEMCELL Technologies) completo suplementado con glutamina al 1% (Sigma). El cultivo se deja durante 48 horas para favorecer la adherencia al plástico de la fracción estromal. En ese momento se realiza un cambio de medio o un pase celular si la confluencia del cultivo es elevada. Los pases celulares se mantienen con MesenCult hasta llegar al pase 3, en el que se realiza una citometría de flujo para caracterizar las mMSCs y se las cambia el medio de cultivo por DMEM de baja glucosa suplementado con 10% FBS y 1% P/S.

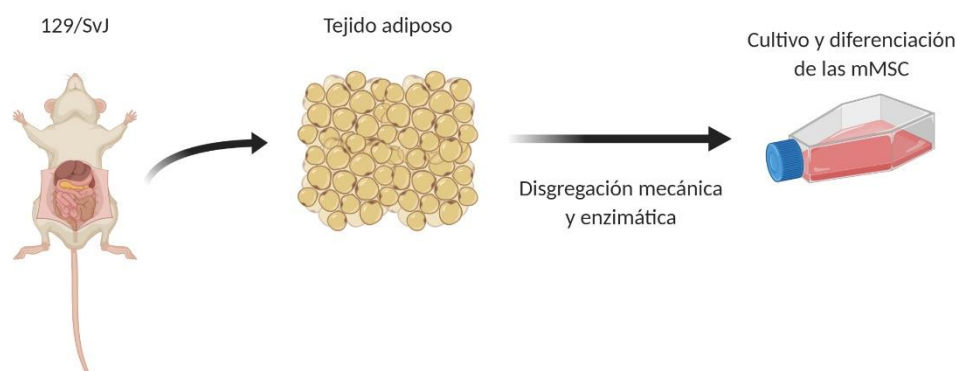


Figura 5: Esquema del procedimiento de obtención de las mMSC a partir del tejido adiposo de los ratones. (Imagen creada con Biorender.com.)

3.3.2.2 – Producción adenoviral.

Para los diversos experimentos que se realizaron en este trabajo, necesitábamos producir nuestro propio *stock* de adenovirus a partir de la muestra cedida por la doctora Spindler. Para ello, utilizamos la línea celular murina 37.1, que sobreexpresa el gen E1A y por lo tanto es extremadamente sensible¹⁴¹ a la infección por el MAV-1, y seguimos los protocolos de producción adenoviral previamente optimizados por el grupo de la doctora Spindler.

La línea celular 37.1 se cultivó en DMEM (4,5 g/L glucosa, Gibco) suplementado con 5% FBS previamente inactivado y 200 µg/mL de G418 (Sigma) para seleccionar las células más permisivas al adenovirus murino (mAdv). Las células se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% de CO₂, y se realizaron los pases celulares necesarios para mantener las células a niveles de subconfluencia.

En el momento de la producción adenoviral, las células se mantuvieron durante el pase previo sin G418 y se indujeron con dexametasona 10⁻⁵ M las 12-24 horas previas a la infección. El día de la infección, las células debían estar aproximadamente a un 70% de confluencia. Se retiraba el medio del cultivo, se lavaban las células con PBS y se añadía el sobrenadante de una producción adenoviral anterior. Las células se cubrían con el sobrenadante durante dos horas

en estufa a 37°C y pasado ese tiempo se les añadía medio de cultivo fresco, tras lo cual las células se mantenían en condiciones estándar de cultivo hasta que se apreciaba un efecto citopático evidente, que solía aparecer entre los 5 y los 10 días tras la infección.

En el momento en que el efecto citopático afectaba al 90% de la población celular, se podían recolectar las dos fracciones del cultivo, el sobrenadante y la fracción celular. Por un lado, se recogía el sobrenadante con ayuda de una pipeta, se transfería a un tubo Falcon, y se centrifugaba a 300 rpm durante 10 minutos para eliminar el resto celular (*debriss*) y la muerte celular. (Estas condiciones de centrifugación no afectan a las partículas virales que se encuentran en el sobrenadante, por lo que no hay riesgo de perder título adenoviral.) El sobrenadante libre de restos celulares se transfería a un nuevo tubo Falcon. En cuanto a la fracción celular, una vez retirado el sobrenadante, se utilizaba un raspador (*scraper*) para retirar cuidadosamente la fracción celular de la placa de cultivo. Con ayuda de medio de cultivo fresco (DMEM sin suplementar) y de una pipeta, se recogía dicha fracción en un nuevo tubo Falcon.

Ambas fracciones de la producción (sobrenadante y células) se almacenaban a -80°C hasta el momento de la cuantificación del título.

3.3.2.3 – Cálculo del título adenoviral.

Se determinó el número de las partículas físicas por espectrofotometría detectando la absorbancia del ADN viral a una longitud de onda de 260 nm.

Para cuantificar el ADN viral, se prepararon tres diluciones a partir del *stock* de sobrenadante en tampón de lisis (buffer TE, 0.1% de SDS), se incubaron durante 5 minutos a 56°C y se procedió a la medición del ADN por espectrofotometría utilizando el Nanodrop.

1/5	5 µL virus + 20 µL tampón de lisis
1/10	5 µL virus + 45 µL tampón de lisis
1/20	5 µL virus + 95 µL tampón de lisis

Se tomaron los valores de absorbancia captados a 260 nm para las tres diluciones y se aplicó la fórmula:

$$vp/mL = DO_{260} \times dilución \times (1 \times 10^{12})$$

Donde: DO_{260} es la densidad óptica medida por el Nanodrop a 260 nm; y 1×10^{12} es el coeficiente de extinción del virus.

El título físico viral (pv/mL) se obtiene de la media de los títulos aportados por el cálculo anterior para cada una de las tres diluciones.

3.3.2.4 – Cálculo de la multiplicidad de infección.

La multiplicidad de infección (MOI) se refiere al número de partículas virales que infectan a una célula. Para calcular la cantidad de partículas virales (*pv*) necesarias por cultivo, se multiplicaba el número de células a infectar por la MOI deseada en cada caso:

$$pv \text{ necesarias} = n^{\circ} \text{ de células del cultivo} \times MOI \text{ deseada}$$

Así, para calcular cuántos microlitros del *stock* de virus se añadían a cada cultivo o suspensión celular, se aplicaba la fórmula:

$$\mu L/pv = \frac{pv \text{ necesarias} \times \text{dilución}}{\text{título viral}}$$

3.3.2.5 – Comprobación de la capacidad lítica de MAV-1 por plaque assay.

Previamente, se había preparado agarosa al 1% esterilizada por autoclave y derretida a 50°C en baño. Las células 37.1 se plaquearon en pocillos de P6 a una confluencia próxima al 80%. Pasadas 24 horas, las células se infectaron con tres diluciones seriadas del sobrenadante viral (1:1000, 1:100 y 1:10) durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras ese tiempo, el medio de infección se retiró y las células se lavaron una vez con PBS 1X (Gibco). Una vez retirado también el PBS, se añadieron 3 mL de una mezcla de agarosa y medio de cultivo (1V agarosa 1% + 1V DMEM 5% FBS) a cada pocillo de la placa P6. La placa se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que la agarosa solidificara. Pasado este tiempo, se añadieron sobre la capa de agarosa otros 2 mL de DMEM al 5% de FBS a cada pocillo. La placa se incubó en estufa a 37° y 5% CO₂ durante diez días, hasta que las placas de lisis aparecieron en el cultivo, vistas al microscopio. En ese momento se retiró el medio de cultivo sobre la agarosa y ésta se tiñó con cristal violeta al 2% en formaldehído, lo que permitió visualizar las calvas de lisis a simple vista.

3.3.2.6 – Comprobación de la capacidad replicativa de MAV-1 en células mesenquimales murinas.

Se infectaron tanto mMSC como células 37.1, y tras la infección las células se lavaron y se refrescó el medio de cultivo. Se recogió el sobrenadante de ambas muestras a los dos días y a los siete días tras la infección. Del sobrenadante se purificó el ADN y se hizo PCR cuantitativa para poder detectar ADN adenoviral en el sobrenadante del cultivo. Se utilizaron *primers* específicos para la detección del ADN de MAV-1 (167 pb) y el ADN genómico total de cada muestra utilizando los *primers* de la apolipoproteína B (ApoB, 100 pb), un gen endógeno que se expresa de forma ubicua en todas las células animales. Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

MAV-1	<i>Forward</i>	5'-GGCCAACACTACCGACACTT-3'
MAV-1	<i>Reverse</i>	5'-TTTTGTCCTGTGGCATTGA-3'
ApoB	<i>Forward</i>	5'-CGTGGGCTCCAGCATTCTA-3'
ApoB	<i>Reverse</i>	5'-AGTCATTCTGCCTTTGCGTC-3'

La proporción de los componentes para una reacción de PCR fue la siguiente para un volumen final de 20 µL:

<i>GoTaq® DNA Polymerase (2X)</i>	10 µL
<i>Primer MAV-1 (forward) (10 µM)</i>	1 µL
<i>Primer MAV-1 (reverse) (10 µM)</i>	1 µL
<i>Agua libre de ADNasa</i>	4 µL
<i>ADN (30 ng)</i>	4 µL
VOLUMEN FINAL DE LA REACCIÓN	20 µL

La reacción de PCR para amplificar la región del hexón detectada por el par de *primers* MAV-1 fue la siguiente:

95° C	95 °C	60 ° C
10 minutos	15 segundos	1 minuto
40 ciclos		

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X con bromuro de etidio para revelar el ADN. Los resultados se visualizaron por luz ultravioleta (ChemiDoc XRS+, BioRad).

3.3.2.7 – Fabricación de Celyvir murino (mCelyvir).

Las mMSCs se mantuvieron en suspensión durante todo el proceso de infección, para lo que se utilizó DMEM sin suplementar. A continuación, se aplicó la fórmula mencionada en el apartado anterior. En nuestro caso, las infecciones se realizaban aplicando una MOI 200. El virus necesario se añadía a la suspensión celular en un tubo eppendorf a un volumen final de 500 µL. La infección se realizaba en estufa a 37°C y en agitación durante una hora y media. Pasado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiraba el sobrenadante del cultivo por aspiración. El botón celular se resuspendía en DMEM fresco sin suplementar, y el *Celyvir* murino quedaba listo para el tratamiento en los animales o cualquier otro proceso experimental (**Figura 6**).

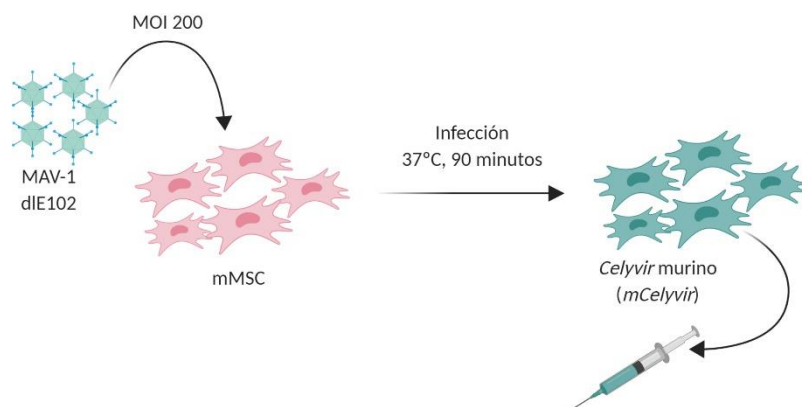


Figura 6: Esquema de la preparación de *Celyvir* murino (*mCelyvir*). (Imagen creada con Biorender.com.)

3.3.3 – Modelo animal: tumor inducido por trasplante ortotópico.

Se decidió estudiar este modelo tumoral inducido como complementario al modelo tumoral espontáneo, debido principalmente a la baja prevalencia tumoral en este último. Para ello, se utilizaron líneas celulares de neuroblastoma murino que se implantaron en la glándula adrenal de ratones salvajes 129/SvJ mediante abordaje por laparotomía.

3.3.3.1 – Líneas celulares de neuroblastoma murino derivadas del ratón TH-MYCN.

Para este trabajo, se utilizaron líneas celulares de neuroblastoma murino crecidas a partir de tumores de ratones transgénicos TH-MYCN, cedidas por el Dr. Louis Chesler.

3.3.3.1.1 – Cultivo de la línea celular 36769 en forma de neuroesferas.

Esta línea celular crecía en suspensión (**Figura 7**), se mantenía en medio DMEM/F12 al 1% P/S, suplementado con 1X B27 sin vitamina A (Gibco), y los factores mEGF (*murine Epidermal Growth Factor*, 20 ng/mL, R&D Systems) y mFGF (*murine Fibroblastic Growth Factor*, 40 ng/mL, R&D Systems).

Cuando se alcanzaban niveles de confluencia, las esferas se transferían a un tubo Falcon y se centrifugaban a 900xg durante 5 minutos. Se retiraba entonces el sobrenadante y se añadía un volumen de tripsina (TripLE Express, Life Technologies, Carlsbad, CA) suficiente para cubrir el pellet. Con ayuda de una micropipeta y con cuidado, se resuspendían las esferas en la tripsina y se incubaban a 37°C en baño durante 5 minutos. Las células, ya disgregadas parcialmente gracias a la tripsina, se lavaban con PBS 1X (Gibco) y se centrifugaban a 1500 rpm durante 5 minutos. Se aspiraba de nuevo el sobrenadante y las células se resuspendían en un volumen pequeño de DMEM/F12 fresco a una dilución 1/6 de la original.

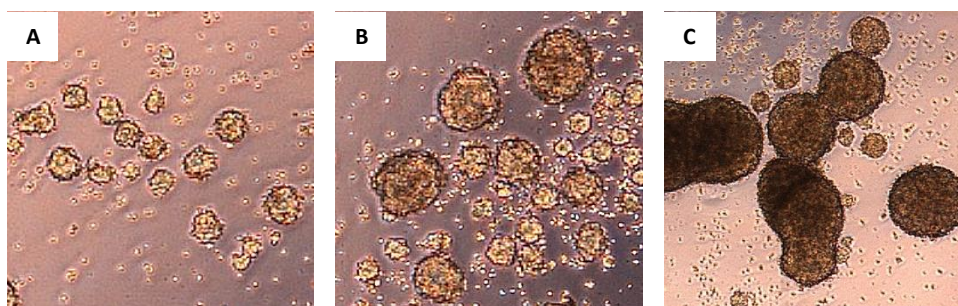


Figura 7: Imagen que muestra el aspecto de las neuroesferas en cultivo dependiendo de su grado de confluencia. Las fotografías corresponden a la línea celular 36769. **A)** Neuroesferas no confluentes, translúcidas y pequeñas. **B)** Neuroesferas que muestran varios grados de confluencia, pudiéndose apreciar tres de ellas que comienzan a dejar de ser translúcidas y, por tanto, susceptibles de someterse a un pase celular. **C)** Neuroesferas confluentes, totalmente opacas, lo que indica que probablemente las células situadas en el centro de la esfera estén sufriendo condiciones de hipoxia y de falta de nutrientes, lo que compromete la viabilidad del cultivo.

3.3.3.2 – Inoculación de la línea tumoral en los animales 129/SvJ mediante trasplante ortotópico.

A cada animal (12-16 semanas de edad) se le inoculaban bajo anestesia 3×10^5 células resuspendidas en un volumen de 30 μL de DMEM/F12 (sin suplementar) directamente en el interior de la glándula suprarrenal con ayuda de una aguja de insulina. Los animales se mantenían sobre manta eléctrica durante toda la cirugía. Para acceder a la zona suprarrenal izquierda se retiraba con cuidado y hacia el exterior el paquete abdominal. Una vez localizada ésta, se procedía a la inyección de las células resuspendidas en 30 μL de medio con ayuda de una jeringa de insulina. A continuación, se procedía a suturar la herida y al animal se le administraba el reversor de la anestesia por vía intraperitoneal (atipamezol, 2 mg/Kg peso) y analgésico (buprenorfina, 5.5 ng/g peso) para el dolor. Se dejaba reposar una semana a los animales para permitir la cicatrización de la herida, y a partir de la segunda semana tras la cirugía se comenzaba la experimentación y la administración del tratamiento. Durante este periodo los animales se mantenían vigilados por si mostraban señales de dolor o malestar.

El procedimiento experimental de este modelo se muestra en la **Figura 8**.

3.3.3.3 – Tratamiento de los animales 129/SvJ con Celyvir murino (mCelyvir).

Después de las dos semanas de reposo tras la cirugía, a los animales se les administraron dos dosis de *mCelyvir* semanales por vía intravenosa (IV). Para ello, los animales eran sometidos a una fuente de calor (lámpara de infrarrojos) para favorecer la dilatación de los vasos sanguíneos, y a continuación se les introducía en un cepo especial para inmovilizar al ratón. La dosis de *mCelyvir* (MOI 200) se inoculaba en la vena de la cola en un volumen total de 150 μL de DMEM/F12 sin suplementar (**Figura 9**). A las 48 horas tras recibir la segunda dosis, los animales eran sacrificados y la masa tumoral se extraía para su análisis.

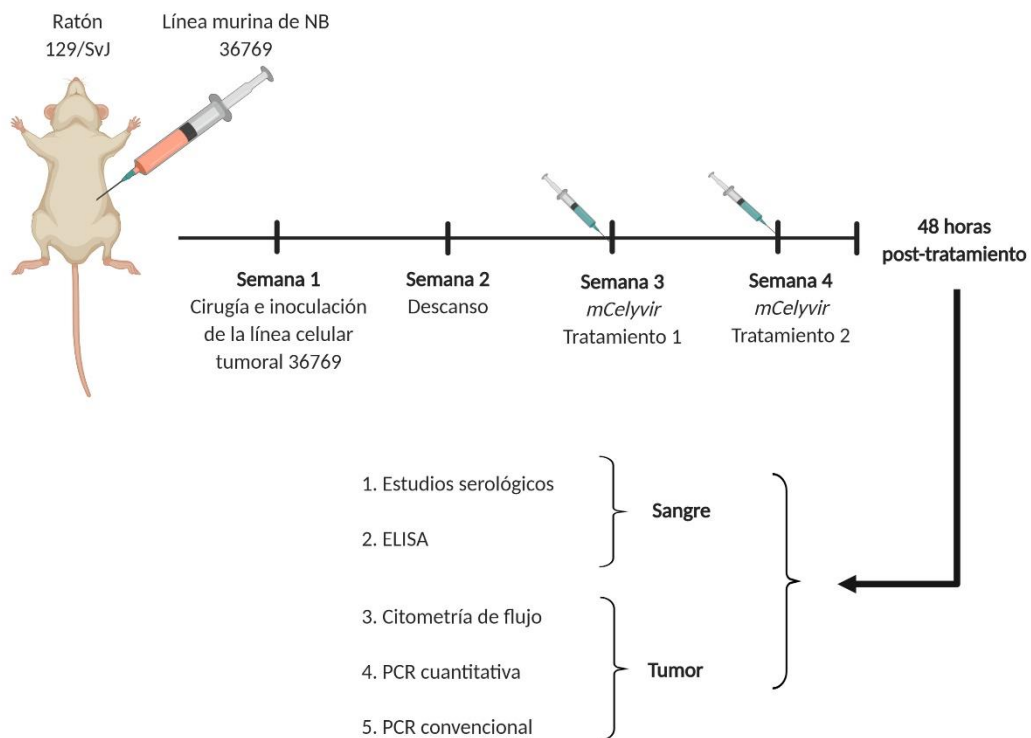


Figura 8: Esquema del procedimiento experimental para el modelo inducido de neuroblastoma. (Imagen creada con Biorender.com.)



Figura 9: Procedimiento de inoculación de *mCelyvir* por vía sistémica en los ratones.

3.3.4 – Modelo animal: tumor espontáneo en ratones TH-MYCN.

El procedimiento experimental para este modelo fue el siguiente:

3.3.4.1 – Selección de animales transgénicos mediante genotipado.

De todos los animales genotipados durante el periodo de realización de esta tesis doctoral, para la realización de esta parte experimental se seleccionaron únicamente a los animales heterocigotos, que supusieron alrededor de un 46% de todas las crías producidas por nuestros cruces parentales.

Periodo	Nº total de ratones	Nº de ratones transgénicos	Porcentaje total de transgénicos
Desde Febrero 2016 a Noviembre 2018	593	276	46.54%

Los ratones no transgénicos (129/SvJ WT) se utilizaron en los experimentos de trasplante. En cuanto a los animales transgénicos (heterocigotos para el transgén TH-MYCN), muchos de ellos desarrollaban tumor antes de poder realizar ninguna manipulación experimental; otros superaban la edad ideal de experimentación en el momento de conocer el resultado del genotipado correspondiente. Por ello, de los 276 ratones disponibles se terminaron utilizando los 86 animales genotipados entre diciembre del 2016 y diciembre del 2017.

Los animales seleccionados como heterocigotos que cumplían las ocho semanas de edad se trataban con *mCelyvir* a dosis MOI 200 durante cuatro semanas por vía intravenosa, independientemente de si se les detectaba tumor o no. Cuando se cumplían las cuatro semanas de tratamiento, los animales se sacrificaban y en ese momento se comprobaba si presentaban tumor o no. El número total de tumores obtenidos por grupo se muestra en la **Tabla 2** (11 ratones con tumor al final del tratamiento entre un total de 34 ratones tratados con *mCelyvir*).

En esta tabla no se representa el total de animales tratados (puesto que algunos de ellos fallecieron por los tumores antes de alcanzar las cuatro semanas de tratamiento), sino sólo aquellos que llegaron con vida tras aplicar las cuatro dosis de *mCelyvir* (total: 34 ratones).

ID RATON	GRUPO	MES EXTO	FECHA SACRIFICIO	
A1	CONTROL	ene-17	14/02/2017	
A2	CONTROL	ene-17	14/02/2017	TUMOR
A3	CONTROL	ene-17	14/02/2017	
A4	CONTROL	mar-17	14/03/2017	TUMOR
A5	CONTROL	mar-17	14/03/2017	
A6	CONTROL	mar-17	14/03/2017	
A7	CONTROL	mar-17	04/03/2017	
A8	CONTROL	mar-17	04/03/2017	
A9	CONTROL	mar-17	04/03/2017	
A10	CONTROL	mar-17	04/03/2017	
A11	CONTROL	jul-17	03/07/2017	TUMOR
A12	CONTROL	jul-17	03/07/2017	
A13	CONTROL	jul-17	03/07/2017	
A14	CONTROL	jul-17	03/07/2017	
A15	CONTROL	jul-17	03/07/2017	
A16	CONTROL	ago-17	01/08/2017	
A17	CONTROL	ago-17	01/08/2017	
A18	CONTROL	sep-17	20/09/2017	TUMOR
A19	CONTROL	sep-17	20/09/2017	TUMOR
A20	CONTROL	sep-17	20/09/2017	
B1	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	ene-17	14/02/2017	TUMOR
B2	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	ene-17	14/02/2017	TUMOR
B3	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	ene-17	14/02/2017	
B4	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	ene-17	14/02/2017	TUMOR
B5	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	mar-17	13/03/2017	
B6	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	mar-17	14/03/2017	
B7	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	mar-17	14/03/2017	
B8	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	abr-17	26/04/2017	TUMOR
B9	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	abr-17	26/04/2017	
B10	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	may-17	15/05/2017	TUMOR
B11	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	may-17	31/05/2017	
B12	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	may-17	31/05/2017	TUMOR
B13	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	may-17	31/05/2017	
B14	CELYVIR ESTÁNDAR (MOI 200)	may-17	31/05/2017	

Tabla 2: Relación de los ratones tratados y no tratados, y de los que generaron tumor dentro de ambos grupos.

3.3.4.2 – Tratamiento de los animales TH-MYCN con Celyvir murino (mCelyvir).

En este caso, a los animales se les administraron cuatro dosis de *mCelyvir* semanales por vía intravenosa a partir de las ocho semanas de edad. Los ratones se dividieron en dos grupos: ratones no tratados (grupo A, control), y dosis estándar de *mCelyvir* (grupo B, MOI 200). Cada dosis se inoculaba en la vena de la cola en un volumen total de 150 μ L de DMEM/F12 sin suplementar. A las 48 horas tras recibir la cuarta dosis, los animales eran sacrificados y la masa tumoral se extraía para su análisis.

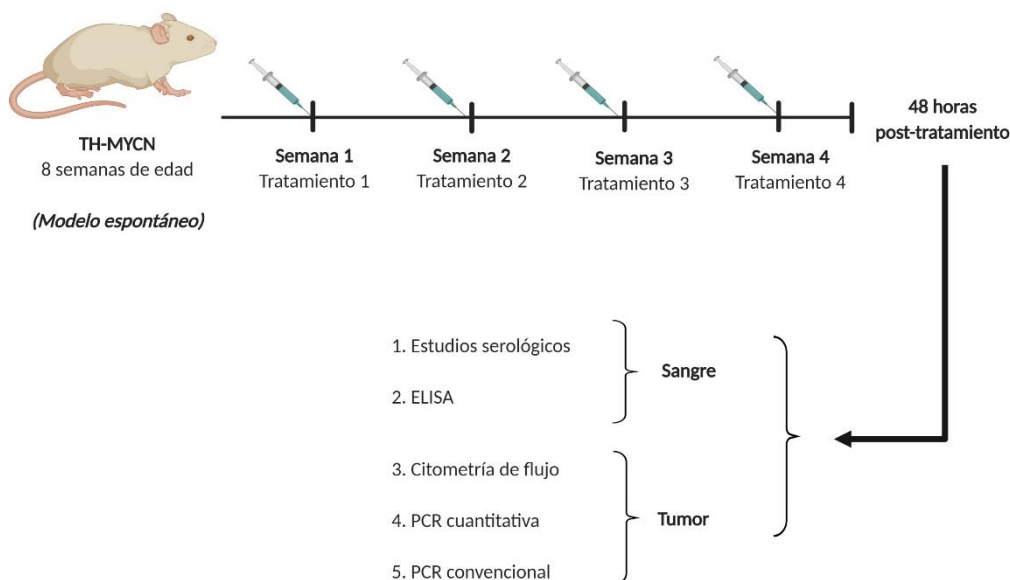


Figura 10: Esquema del procedimiento experimental para los animales TH-MYCN (generación de tumor espontánea). (Imagen creada con Biorender.com.)

3.3.5 – Sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras extraídas.

El sacrificio se llevaba a cabo a las 48 horas tras la última dosis de *mCelyvir*.

3.3.5.1 – Sacrificio de los animales.

Los animales eran anestesiados con avertina (tribromoetanol). Una vez dormidos, eran exanguinados y se les practicaba una dislocación cervical para sacrificarlos. Una vez fallecido el ratón, se procedía a la extracción de la masa tumoral a través de la incisión. Durante la extracción se ponía especial cuidado en no provocar la rotura de vasos sanguíneos adyacentes ni de extraer órganos distintos a la propia masa tumoral. A continuación, el tumor se medía con ayuda de una regla, y se dividía en tres partes para su estudio: tres cuartas partes del tumor (aproximadamente) se introducían en un tubo Falcon solución balanceada salina de Hank (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) 1X y se mantenían en hielo para su posterior estudio por

citometría de flujo; la cuarta parte del tumor restante se introducía en un tubo eppendorf en seco y se introducía en nieve carbónica para su conservación y estudio de ARN.

3.3.5.2 – Procesado de los tumores.

La masa tumoral contenida en HBSS 1X se lavaba en una placa Petri con HBSS 1X o PBS 1X fresco para retirar en la medida de lo posible el exceso de sangre. A continuación, la masa tumoral se disgregaba mecánicamente con ayuda de bisturíes, pinzas y/o tijeras en la misma placa. Una vez procesada mecánicamente, el tejido tumoral se introducía en un Falcon con colagenasa D (Roche) a una concentración de 1 mg/mL de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) sin suplementar. El Falcon con la suspensión se incubaba en baño a 37° durante una hora o hasta que el tejido tumoral estuviera disgregado casi por completo. Durante todo el proceso, la suspensión se agitaba o se pasaba el volumen por una pipeta para favorecer la disgregación del tejido. Por último, la suspensión se filtraba por un tamiz de 40 µm para desechar los restos de grasa y tejido no disgregado.

La suspensión celular obtenida se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 minutos, y el pellet celular se resuspendía en medio de cultivo fresco. Las células se contaban entonces con ayuda del colorante Türk.

Una vez realizado el conteo, se distribuían 5×10^5 células por cada tubo de citometría con sus correspondientes anticuerpos. Las células se incubaban 30 minutos a 4°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se añadían 500 µL de buffer de lisis de eritrocitos (Quicklysis, Cytognos #CYT-QL-1) por cada tubo. Las células se incubaban media hora en oscuridad a temperatura ambiente antes de pasar los tubos por el citómetro.

3.3.5.3 – Procesado de la sangre.

La sangre obtenida durante la exanguinación de los animales se almacenaba en un eppendorf con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar su coagulación. Con la sangre se realizaban estudios por citometría de flujo y serología.

Para la citometría, se marcaban 50 µL de sangre completa con los anticuerpos correspondientes y se incubaban durante 30 minutos a 4°C. A continuación, el componente eritrocítico de la sangre se lisaba con el QuickLisis buffer (Cytognos #CYT-QL-1) durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. A partir de ese momento la sangre estaba lista para analizarse por citometría de flujo.

Para los estudios serológicos, la sangre completa se congelaba a -20 °C. En el momento de necesitarse el suero, el componente eritrocítico se había lisado y precipitado por congelación, dejando el suero libre y listo para su uso.

3.3.6 – Citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares inmunes en el tumor.

Para analizar el componente inmune de los animales por citometría de flujo, tanto tumores como la sangre, se utilizaron los siguientes anticuerpos (**Tabla 3**):

Anticuerpo	Fluoróforo	Referencia	Casa comercial
CD11b Antibody	APC	101212	Biolegend
CD8a Antibody	APC	100712	Biolegend
CD25 Antibody	APC/Cy7	102026	Biolegend
CD279 (PD-1) Antibody	APC/Cy7	135223	Biolegend
CD11c Antibody	APC/Cy7	117324	Biolegend
Ly-6A/E (Sca-1) Antibody	APC/Cy7	108125	Biolegend
Ly-6G Antibody	APC/Cy7	127624	Biolegend
CD45 Antibody	Brilliant Violet 510™	103138	Biolegend
CD62L Antibody	Brilliant Violet 510™	104441	Biolegend
CD103 Antibody	FITC	121419	Biolegend
CD206 (MMR) Antibody	FITC	141704	Biolegend
CD44 Antibody	FITC	103022	Biolegend
CD45R/B220 Antibody	FITC	103206	Biolegend
CD134 / OX40 Antibody	FITC	MA5-17917	Fisher
CD137 (4-1BB) Antibody	FITC	558975	BD
CD4 Antibody	Pacific Blue™	100531	Biolegend
Ly-6C Antibody	Pacific Blue™	128013	Biolegend
CD11c Antibody	PE	117308	Biolegend
CD122 (IL-2Rβ) Antibody	PE	123209	Biolegend
CD123 Antibody	PE	106005	Biolegend
CD223 (LAG-3) Antibody	PE	125207	Biolegend
CD3ε Antibody	PE	100308	Biolegend
CD11c Antibody	PE	117308	Biolegend
CD152 (CTLA-4) Antibody	PE/Cy7	106313	Biolegend
CD366 (Tim-3) Antibody	PE/Cy7	119715	Biolegend
F4/80 Antibody	PE/Cy7	123114	Biolegend
CD95 Antibody	Pecy7	557653	BD
NK-1.1 Antibody	PE/Cy7	108714	Biolegend
CD80 Antibody	PE/Cy7	104734	Biolegend
7AAD Viability Staining	PERCP/CY7	420404	Biolegend

Tabla 3: Detalle de los anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Estos anticuerpos se distribuyeron en los tubos de citometría de tal manera que nos permitieran analizar el máximo de poblaciones celulares en el mínimo número de tubos posibles.

La plantilla que se diseñó se muestra en la **Tabla 4**. La citometría se llevó a cabo con el citómetro FACSCanto II, y los datos se analizaron con el software FACSDiva.

Una imagen de la estrategia de citometría de flujo que se siguió para identificar las poblaciones inmunes dentro de las masas tumorales se puede observar en la **Figura 11**. El análisis del FACS Diva se configuró para obtener el total de eventos a partir de la población CD45+ de cada uno de los tumores, para enriquecer las poblaciones inmunes subsecuentes.

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PE/CY7</i>	<i>PERCP/CY5</i>	<i>APC</i>	<i>APC/CY7</i>	<i>P.BLUE</i>	<i>AM-CYAN</i>
Tubo 1	B220	CD3	NK1.1	7AAD	CD11B	CD11C		CD45
Tubo 2	CD44	CD122	CD95	7AAD	CD8	Sca-1	CD4	CD62L
Tubo 3	OX40	CD3	CTLA4	7AAD	CD8	CD25	CD4	CD45
Tubo 4	4-1BB	LAG3	TIM3	7AAD	CD8	PD1	CD4	CD45
Tubo 5	CD206	CD11C	F4/80	7AAD	CD11B	LY6G	LY6C	CD45
Tubo 6	CD103	CD123		7AAD	CD11B	CD11c		CD45

Tabla 4: Plantilla de anticuerpos empleados en citometría de flujo.

3.3.7 – Estudios serológicos mediante técnica de ELISA.

Para llevar a cabo una detección paralela de los anticuerpos de MAV-1 en la sangre los ratones, se utilizó el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para estudios serológicos de ratón FL/K87 de Dynamimed. Se siguió el protocolo que indican los fabricantes. Para ello, las muestras de sangre periférica se centrifugaron para obtener el suero, que se diluyó 50 veces para llevar a cabo el ELISA. Las muestras se incubaron en la placa junto con sus respectivos controles positivos y negativos durante 45 minutos a 37°C. Los pocillos de la placa se lavaron con cuidado un total de cinco veces antes de añadir el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y volver a incubar 45 minutos a 37°C. Después de los últimos cinco lavados, se añadió el sustrato de la peroxidasa y la placa se incubó durante 30 minutos antes de medir la absorbancia a 495 nm.

3.3.8 – Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa.

3.3.8.1 – Extracción de ARN.

Un fragmento de los tumores se congelaba en seco a -80°C para conservar la integridad del ARN y de las proteínas hasta el momento de su manipulación. La extracción de ARN se realizó con el RNeasy Mini kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron de 30 µg de tejido por cada muestra, salvo en casos donde la cantidad de tumor era menor y se utilizaba menor cantidad de tejido.

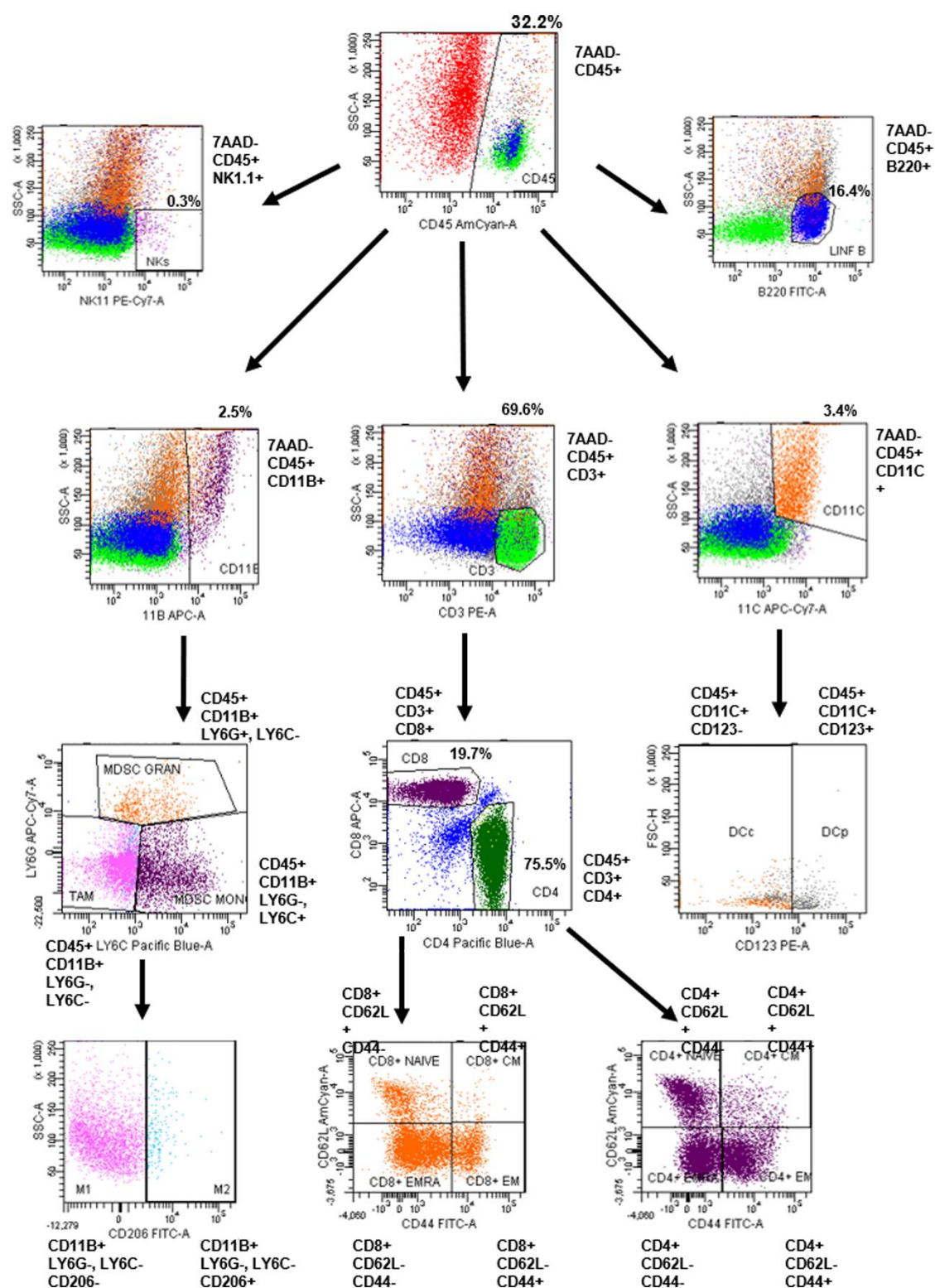


Figura 11: Esquema que muestra la estrategia de citometría de flujo empleada para identificar las poblaciones inmunes en los tumores de los ratones.

El tejido congelado se trituraba con ayuda de un homogeneizador mecánico (ref# 431-0110, VWR) en buffer RLT con β -mercaptoetanol. A continuación, se eliminaba el ADN genómico de la muestra y tras sucesivos lavados se eluía el ARN en agua libre de ARNasa.

3.3.8.2 – Reacción de la retrotranscriptasa inversa.

La reacción de retrotranscripción inversa para obtener del cADN complementario a la secuencia de ARN se realizó con 1 μ g de ARN por muestra utilizando el SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) como se indica a continuación:

- 1 μ g de ARN.
- 4 μ L de SuperScript™ VILO™ Master Mix.
- Volumen necesario de agua hasta completar la reacción.

La reacción para sintetizar cADN con este kit se indica a continuación:

25 °C	42 °C	85°C
10 minutos	60 minutos	5 minutos

El cADN obtenido se diluía diez veces más y se conservaba a -20°C hasta el momento de realizar la qPCR.

3.3.8.3 – Reacción de qPCR.

Para las reacciones de qPCR, se utilizó el sistema de sondas TaqMan (TaqMan Gene expression assays, Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) con los ensayos que se detallan a continuación:

Gen	Sinónimo	Referencia
ARG1	Arginasa-1	Mm00475988_m1
ARG2	Arginasa-2	Mm00477592_m1
CCL2	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)	Mm00441242_m1
CD80	B7.1. Molécula coactivadora de linfocitos.	Mm00711660_m1
CD86	B7.2. Molécula coactivadora de linfocitos.	Mm00444543_m1
CXCL10	Proteína inducida por interferón gamma	Mm00445235_m1
FoxP3	Forkhead box P3	Mm00475162_m1
IFN γ	Interferon gamma	Mm01168134_m1
IL-10	Interleuquina 10	Mm00439614_m1
PDL1	Ligando 1 de muerte programada	Mm00452054_m1
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta	Mm01178820_m1
VEGFa	Factor de crecimiento endotelial vascular A	Mm01281449_m1
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible	Mm00440502_m1
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Mm99999915_g1

La reacción de qPCR se lleva a cabo utilizando Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), y la proporción de los elementos para una reacción de qPCR es la siguiente para un volumen final de 20 μL :

<i>TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)</i>	10 μL
<i>TaqMan Gene expression assay (20X)</i>	1 μL
<i>Agua libre de ADNasa</i>	4 μL
<i>cADN</i>	5 μL
VOLUMEN FINAL DE LA REACCIÓN	20 μL

La reacción de qPCR para los ensayos TaqMan es estándar para todas las sondas diseñadas por Applied Biosystems, y de esta manera, para este trabajo también se siguieron las instrucciones del fabricante respecto a la reacción de qPCR, que son las siguientes:

50 °C	95° C	95 °C	60 ° C
2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto
40 ciclos			

Se utilizó el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) y los datos se analizaron con el software 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA). Cada ensayo se realizó por duplicado en placas de 96 pocillos. Como gen control endógeno se utilizó GAPDH en todos los ensayos.

3.3.9 – Estudios de biodistribución y de cinética viral.

3.3.9.1 – Biodistribución del adenovirus murino en los distintos órganos.

Para comprobar la distribución de *mCelyvir* en los animales sometidos al tratamiento, se utilizaron ratones 129/SvJ implantados con la línea celular 36769. Se estudiaron dos grupos con diferente tratamiento: un grupo de ratones ($n = 3$) que recibió *mCelyvir* por vía intravenosa, y un segundo grupo ($n = 3$) que recibió una dosis equivalente de adenovirus MAV-1 desnudo. Los tratamientos se administraron en ambos casos una vez por semana durante tres semanas. Después del tercer tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se recuperaron diferentes órganos para analizar la presencia de ADN viral en los diferentes tejidos. Los órganos escogidos fueron la médula ósea, el bazo, los pulmones, los riñones, la sangre periférica y la masa tumoral.

Para la detección del adenovirus MAV-1 en los tumores, se realizó una PCR convencional a partir de 30 ng de ADN genómico usando la DNA polimerasa GoTaq (Promega, #M7822) y los *primers* específicos para MAV-1 (ya indicados en el apartado 3.3.2.6 del presente texto):

MAV-1	<i>Forward</i>	5'-GGCCAACACTACCGACACTT-3'
MAV-1	<i>Reverse</i>	5'-TTTTGTCCTGTGGCATTGA-3'

La reacción de PCR consistió en los siguientes ciclos:

95° C	95 °C	60 ° C
10 minutos	15 segundos	1 minuto
40 ciclos		

Para cuantificar la presencia de adenovirus en los distintos órganos, se utilizaron los mismos primers en una reacción de PCR cuantitativa (qPCR) usando SYBR Green (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) y cuantificando la reacción con el instrumento 7500 Real-Time PCR system. Los resultados se analizaron utilizando el software 7500 Real-Time PCR.

3.3.9.2 – Cinética de las partículas virales en la sangre periférica.

Para estudiar la cinética de las partículas virales en la sangre periférica, los animales tratados del apartado anterior fueron sometidos a una extracción de sangre justo antes de recibir el tratamiento y también dos días después del mismo. Se realizó qPCR usando los primers para el hexon MAV-1 y de la ApoB como control endógeno (especificados en el punto 3.3.2.6.).



4. – RESULTADOS

4.1 - Características biológicas de *Celyvir* asociadas a respuesta clínica

Celyvir es un medicamento de terapia avanzada (MTA) fabricado con células mesenquimales autólogas y el adenovirus oncolítico ICOVIR-5. Existe una variabilidad asociada a las características individuales e intrínsecas de las células del MTA que pueden tener un impacto en la calidad del medicamento, que a su vez puede afectar a la respuesta clínica. Hemos estudiado de forma exhaustiva estas características biológicas en los diferentes productos *Celyvir* administrados a la primera cohorte de pacientes, según el esquema recogido en la **Figura 12**. Mediante una aproximación analítica de biología de sistemas, hemos identificado programas biológicos que presentaron funcionamientos diferentes entre los pacientes respondedores al tratamiento y los no respondedores. Además, identificamos moléculas responsables de dichas diferencias. Estos candidatos fueron validados en una segunda cohorte de pacientes tratados con *Celyvir*.

4.1.1 – Análisis inicial de los resultados crudos del secretoma y del transcriptoma de *Celyvir*.

4.1.1.1 – Análisis del secretoma.

Se comenzó con un análisis estadístico para encontrar diferencias de expresión de las proteínas presentes entre los pacientes respondedores y los no respondedores. Para cada proteína analizada, se comparó el nivel de expresión frente a la expresión basal, y el valor resultante se utilizó en las comparaciones entre los dos grupos de pacientes. La lista completa de proteínas candidatas que se encuentran bien sobreexpresadas o bien reguladas a la baja, se puede encontrar en el Anexo 5, que incluye información del valor del cambio en el incremento y la media de expresión de cada una de las proteínas o moléculas para cada grupo de pacientes.

Un total de 121 proteínas extraídas del análisis del secretoma se seleccionaron por su presencia diferencial entre las muestras de los pacientes respondedores y los no respondedores. Se detectó una infraexpresión estadísticamente significativa en 69 de las proteínas detectadas en el secretoma de los pacientes respondedores, si se comparaban con los no respondedores. Un total de 52 proteínas estaban sobreexpresadas en el secretoma de los pacientes que respondieron a *Celyvir*.

Un grupo de 6 proteínas adicionales (VWF, SERPINE1, EPHB3, NTRK2, MUC16, SRMS) solo fueron detectadas en el grupo de pacientes respondedores.

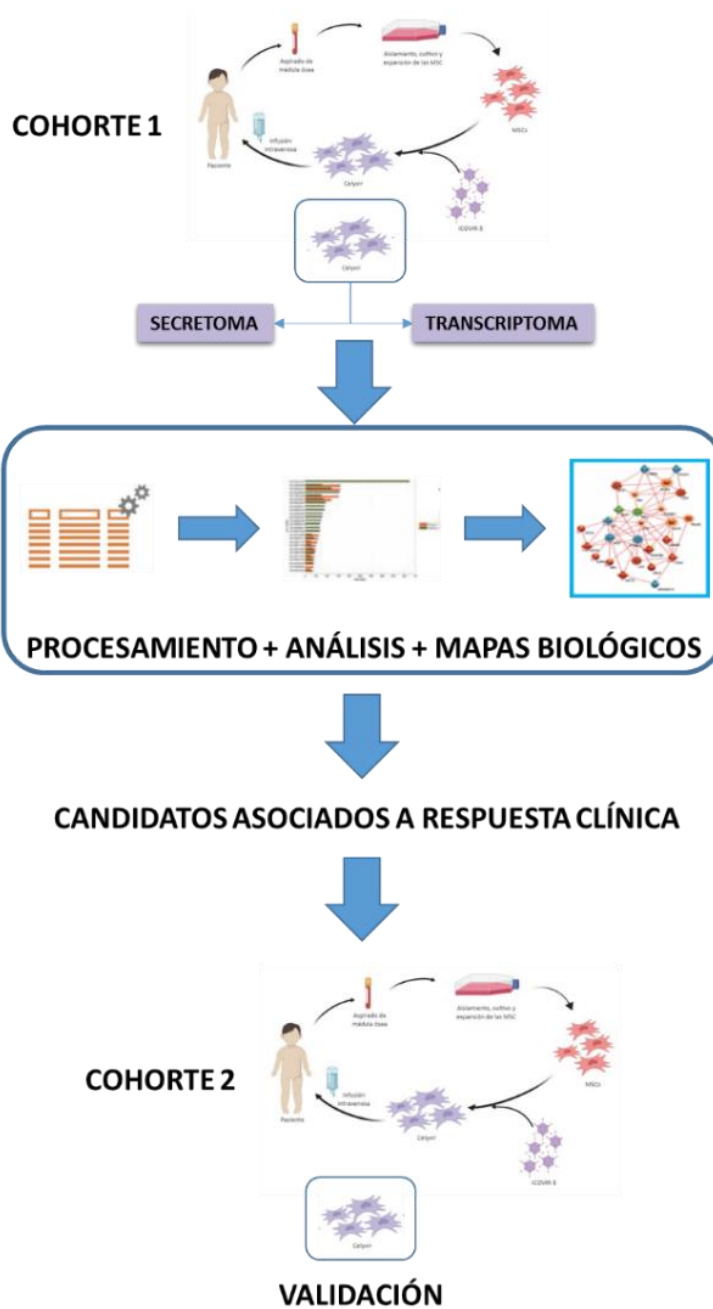


Figura 12: Esquema del proceso experimental para el estudio de las características de *Celyvir* en los pacientes. (Imagen creada con Biorender.com.)

La **Tabla 5** contiene los candidatos que presentan un comportamiento opuesto entre los pacientes respondedores y no respondedores tras el tratamiento (es decir, que están sobreexpresadas o infraexpresadas de manera opuesta).

UniProt ID	Gene name	Candidate (1= UP/ -1 = DOWN)	FC RESPONSE vs Control	FC NON-RESPONSE vs Control
Q14766	LTBP1	1	1,894	0,607
P16591	FER	1	4,668	0,899
Q6EMK4	VASN	1	2,287	0,004
P05112	IL4	-1	0,017	6,795
P22003	BMP5	-1	0,270	8,693
P42702	LIFR	-1	0,078	1,837
P09237	MMP7	-1	0,783	5,464
Q15109	AGER	-1	0,586	3,374
P27539	GDF1	-1	0,124	1,084
O15389	SIGLEC5	-1	0,424	1,339
P48023	FASLG	-1	0,371	1,401
Q14005	IL16	-1	0,737	1,976
P35443	THBS4	-1	0,783	1,383
P37173	TGFBR2	-1	0,997	3,294
P01127	PDGFB	-1	0,640	1,539
P04085	PDGFA	-1	0,640	1,539
P09603	CSF1	-1	0,685	1,604
P61812	TGFB2	-1	0,727	2,129
P01189	POMC	-1	0,692	1,465
P22792	CPN2	-1	0,592	1,247
O15123	ANGPT2	-1	0,426	1,121
P51671	CCL11	-1	0,636	1,594
Q13007	IL24	-1	0,710	1,324
P09238	MMP10	-1	0,898	1,639
P11226	MBL2	-1	0,876	1,512
P42166	TMPO	-1	0,664	1,100
O43557	TNFSF14	-1	0,728	1,171
P06727	APOA4	-1	0,999	1,567
Q969J5	IL22RA2	-1	0,883	1,371
P39900	MMP12	-1	0,678	1,049

Tabla 5: Candidatos con comportamientos opuestos entre respondedores y no respondedores. La regulación es relativa siempre al grupo de respondedores. En las últimas dos columnas se representa el incremento de cada uno de los candidatos. El color verde indica sobreexpresión, mientras que el color rojo indica infraexpresión.

Teniendo en cuenta todos los criterios nombrados anteriormente (expresión diferencial, expresión exclusiva, expresión opuesta), un total de 127 proteínas se seleccionaron como candidatos para explicar las diferencias entre los pacientes respondedores y no respondedores:

- Tres (3) de ellas estaban sobreexpresadas solo en el grupo de los respondedores cuando se comparan con los controles: vasorina, TGF- β 1 latente y FER.
- Quince (15) de ellas estaban sobreexpresadas solo en el grupo de los no respondedores cuando se comparan con los controles: PDGF-AB (formada por PDGFA y PDGFB), Eotaxina / CCL11, RAGE, BMP-5, LIF R alfa, IL-4, ApoA4, TGF-beta RII, MMP-10, MBL-2, MMP-7, IL-16, TGF-beta 2 y M-CSF.

4.1.1.2 – Análisis del transcriptoma.

Los datos del transcriptoma se trataron con análisis estadísticos clásicos con el fin de identificar genes con mayor expresión diferencial entre las MSC de los respondedores y los no respondedores. En una primera aproximación, se tuvieron en cuenta dos grupos de genes: los que presentaban un enriquecimiento estadísticamente significativo con un nivel de error del 1% ($p < 0.01$) y aquellos a los que se les había aplicado un criterio menos restrictivo ($p < 0.05$) para poder elaborar una lista más extensa de resultados potencialmente interesantes. Se realizaron tres test estadísticos (ANOVA, Wilcoxon y T-student) para evaluar las diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica entre los pacientes respondedores y los no respondedores. Se obtuvieron muy pocos resultados positivos después del multi-test corregido ($FDR < 0.05$): únicamente 15 resultados y solo los derivados del test ANOVA (**Tabla 6**).

Siendo menos restrictivo estadísticamente, un total de 113 genes presentaron un p-valor significativo no corregido ($p\text{-valor} < 0.01$) para al menos uno de los tres test llevados a cabo.

4.1.1.3 – Comparación combinada del transcriptoma y secretoma de las muestras.

Se encontraron un total de 10 interacciones entre 4 de las 15 proteínas diferencialmente expresadas (transcriptoma) y 9 de las 127 proteínas diferencialmente excretadas (secretoma) (**Tabla 7**). La única proteína común en ambos análisis, la metaloproteinasa 10 (MMP-10), servía de enlace principal entre ambos análisis al interaccionar con 5 proteínas diferentes secretadas (MMP-1, MMP-7, ProSAAS, Galanina y TGF- β 1 latente). Se presentaba como contradictoria en ambos análisis: mientras que se encontraba reducido en el secretoma de los pacientes respondedores, su expresión en el transcriptoma aparecía incrementada en el mismo grupo de pacientes. La proteína diferencialmente expresada glomulina (GLMN) interactuaba con dos proteínas del secretoma (el factor de crecimiento de hepatocitos, HGFR; y la vasorina).

Uniprot ID	Nombre del Gen	Secretoma	ANOVA FDR q-value	Log ₂ FC	FC
P35573	AGL	No	0,01280	6,49492	90,19145
P09238	MMP10	Sí	0,01280	8,65044	401,83075
Q12834	CDC20	No	0,01280	-8,88274	0,00212
P11597	CETP	No	0,01280	-9,02274	0,00192
P19404	NDUFV2	No	0,01280	-10,89015	0,00053
P16284	PECAM1	No	0,01280	-7,35809	0,00610
A2AJT9	CXorf23	No	0,01280	-6,79375	0,00901
P17021	ZNF17	No	0,02209	-9,33322	0,00155
Q8IWX8	SUGP1	No	0,02236	8,37531	332,06250
Q96Q89	KIF20B	No	0,02236	6,68242	102,70893
Q8TE49	OTUD7A	No	0,02236	-8,93858	0,00204
Q92990	GLMN	No	0,02236	-8,57028	0,00263
Q9NZH4	PTTG3P	No	0,02236	-10,71427	0,00060
O60930	RNASEH1	No	0,04146	8,51271	365,24350
O75153	CLUH	No	0,04974	-1,65012	0,31861

Tabla 6: Genes candidatos que en una primera aproximación presentaban diferencias significativas entre el grupo de pacientes respondedores y no respondedores.

Proteínas del Secretoma	Proteínas del Transcriptoma
PECAM1	CXCR4
MMP-10	MMP-7
	MMP-1
	ProSAAS
	Galanina
	TGF-β1 latente
CDC20	GMNN
GLMN	HGFR
	Vasorina

Tabla 7: Relación de las 4 proteínas del secretoma que presentan interacciones con 9 de las proteínas del transcriptoma.

Finalmente, se identificaron dos interacciones adicionales entre proteínas del transcriptoma y el secretoma: la que existía entre la molécula de adhesión PECAM1 y la fusina (receptor de quimioquinas CXCR4); y la existente entre las proteínas del ciclo celular CDC20 y la geminina (GMNN).

Además de la superposición entre los datos del secretoma y el transcriptoma, las interacciones entre los grupos de genes diferencialmente expresados en el transcriptoma (q-valor FDR < 0.05) y los grupos de proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma también se tuvieron en cuenta en el análisis.

4.1.2 – Análisis de enriquecimiento mediante GSEA.

Los datos anteriores se volcaron en la plataforma GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) para identificar las rutas y los procesos moleculares diferenciales entre las MSC de los pacientes que respondieron a la terapia con *Celyvir* y los que no. Esta aproximación proporciona una lista ordenada de genes que se posicionan en la zona superior de la misma cuanto más significativa sea la diferencia. En este caso, el parámetro usado para clasificar dichos genes fue la ratio entre la señal emitida y la señal del “ruido” (*background*) para cada muestra. Aquellos que presentaban señal de ruido en todas las muestras fueron excluidas del análisis por GSEA. Con estos criterios, se transformaron los niveles de expresión de 13715 genes en el parámetro ratio señal-ruido. Un total de 5601 genes se dejaron fuera del análisis ya que no se detectaba señal en ninguna de las muestras.

La lista completa de las rutas enriquecidas para ambos grupos de pacientes se puede encontrar en el Anexo 6. Se han utilizado los p-valores no corregidos restrictivos (p-valor < 0.01) para generar, interpretar y discutir los resultados que se exponen a continuación.

Se encontraron 81 rutas significativamente enriquecidas para la cohorte de pacientes respondedores a *Celyvir*, y 59 rutas para la cohorte de pacientes no respondedores.

Los procesos y rutas más relevantes proporcionados por el análisis de GSEA fueron:

1. **Infeción viral y metabolismo de los ácidos nucleicos.** Los resultados del GSEA indicaron que la expresión de los genes implicados en estos procesos se encontraba aumentada en la cohorte de pacientes respondedores respecto a la de los no respondedores. Algunos procesos relacionados con los ácidos nucleicos aparecen como representativos de la cohorte de pacientes respondedores, incluyendo grupos de genes relacionados con mecanismos de regulación de la transcripción del ADN, replicación del ADN, interacción ADN-ARN ribosomal, empalme (*splicing*) de ARN y traducción. De manera adicional, grupos de genes directamente relacionados con biología viral (regulación positiva de la liberación del virus por la célula huésped, ciclo vital viral) aparecen sobreexpresados en muestras de pacientes respondedores.

2. **Procesos relacionados con la respuesta inmune.** Estos procesos aparecían aumentados en las MSCs de ambas cohortes de pacientes. Sin embargo, la clase de procesos de este tipo fue diferente según la cohorte. Los pacientes respondedores presentaron enriquecimiento de rutas relacionadas con el IFN γ , así como procesos relacionados con la biología de las células T; ambos procesos son conocidos por constituir mecanismos de respuesta antiviral. En el caso de los pacientes no respondedores, existe una mayor presencia de procesos relacionados con la capacidad fagocítica. De igual modo, este grupo de pacientes presenta una cantidad aumentada / una mayor abundancia de procesos de migración de células inmunes. La mayoría de ellos (“diapédesis”, “adhesión de monocitos”, “extravasación leucocitaria”, etc) contienen PECAM1, que aparece expresado en todas las muestras de los pacientes no respondedores. Los pacientes no respondedores también presentaron una expresión aumentada de proteínas relacionadas con el incremento de la permeabilidad de los vasos.
3. **Rutas de señalización regulatoria de las MSCs.** Se detectaron diferencias en vías asociadas a regulación negativa y positiva de la migración de las MSCs en ambas cohortes de pacientes. Estas rutas incluyen señalización de HGF, señalización de taquicinas, señalización de la vía de Hippo, señalización de la vía de NOTCH, señalización de la vía Wnt y señalización de la vía de MAPK.
4. **Adhesión célula-célula.** Ambas cohortes de pacientes presentaron diferencias en grupos de genes relacionados con la adhesión célula-célula: los respondedores en desmosomas y uniones comunicantes; mientras que los pacientes no respondedores presentaron mayoritariamente procesos relacionados con reestructuración del citoesqueleto.
5. **Mitosis.** Un número importante de grupos de genes relacionados con la mitosis aparecieron sobreexpresados en las MSCs de los pacientes respondedores, comparados con las MSCs de los pacientes no respondedores. Por otra parte, las muestras de los pacientes no respondedores presentaron sobreexpresión del conjunto de genes que define la regulación de la proliferación de las células madre.
6. **Metabolismo.** Ambas cohortes de pacientes presentaron diferencias en genes relacionados con el metabolismo, principalmente con el glicógeno, proteínas y metabolismo de lípidos. En ambos grupos de pacientes se mostró aumentado el metabolismo del glicógeno, que se da bien por catabolismo directo (representado mayormente por AGL, que se expresaba de manera consistente en los pacientes respondedores mientras que no lo hacía en los no-respondedores); o bien por regulación negativa de la glicogénesis en los no-respondedores. Las muestras de los pacientes respondedores presentaron enriquecimiento de genes relacionados con el

metabolismo de proteínas, incluyendo actividad de peptidasa y metabolismo de péptidos y aminoácidos. Por otro lado, los pacientes no respondedores presentaron un aumento de genes relacionados con el metabolismo de lípidos (producción de isoprenoides, y regulación y producción de ácidos grasos y lipoproteínas).

7. **Respuesta al estrés.** Ambos grupos de pacientes presentaron aumentadas determinadas rutas relacionadas con la respuesta al estrés (respuesta al estrés de los orgánulos; daño del ADN inducido por fosforilación; regulación de la respuesta del ADN al daño; y estrés del retículo endoplasmático).
8. **Fibrosis de la médula ósea.** Las muestras de los pacientes no respondedores presentaron un enriquecimiento en genes relacionados con la fibrosis de la médula ósea cuando se comparaban con los pacientes respondedores, incluyendo factores angiogénicos (VEGFA, VEGFB, PDGFA), citoquinas proinflamatorias (IL1A e IL1B) y factores remodeladores de la matriz extracelular (MMP-14).

A continuación, se evaluó si las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de las MSCs de pacientes respondedores y no respondedores formaban parte de los procesos que habían aparecido enriquecidos en el GSEA (p -valor < 0.01). En este sentido, se vio que 27 de los 127 candidatos participaban en al menos uno de los conjuntos de genes enriquecidos (12 de 81 en los pacientes respondedores; y 9 de 59 en los pacientes no respondedores). Un total de 17 proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de las MSCs entre los pacientes respondedores y no respondedores formaban parte de los conjuntos enriquecidos en las muestras de los pacientes respondedores. Por otro lado, 15 proteínas diferencialmente expresadas y presentes en el secretoma de ambos grupos de pacientes formaban parte de conjuntos de proteínas enriquecidos en los pacientes no respondedores.

4.1.3 – Análisis mediante aproximación de biología de sistemas.

El primer análisis o aproximación tenía como objetivo simplemente la identificación de aquellos genes o proteínas que se expresaban con mayor o menor intensidad en cada uno de los grupos de pacientes (Anexo 9 de la versión digital de este documento). A continuación, realizamos un análisis en mayor profundidad de los procesos que podían resultar más relevantes en la eficacia o actividad de *Celyvir*: los que tenían relación con la respuesta inmune al virus y con la replicación viral. Para ello, los candidatos fueron evaluados mediante los análisis matemáticos de biología de sistemas y de ANNs (*Artificial Neural Networks*).

El modelo ANNs evalúa las relaciones que existen entre conjuntos de regiones dentro de la red o matriz generada (en nuestro caso, genes y/o proteínas), proporcionando una puntuación (o *score*) predictivo que cuantifica la probabilidad de existencia de relaciones o conexiones

funcionales entre las regiones evaluadas (en nuestro caso, los conjuntos de genes / proteínas evaluados). Cada puntuación se asocia con un p-valor que indica la probabilidad de que el resultado sea estadísticamente significativo. Según el valor del p-valor, se definen grupos de proteínas que poseen:

- Una **relación fuerte** con los procesos que se estudian en ese momento si el conjunto de proteínas posee una relación predictiva fuerte o medianamente fuerte con cualquiera de los subprocesos usados para la caracterización (p-valor < 0.05).
- Una **relación media** con los procesos que se estudian en ese momento si presentan al menos relación de valor medio con cualquiera de los subprocesos usados para la caracterización (p-valor < 0.075 – 0.25).
- Una **relación débil o inexistente** con los procesos que se estudian en ese momento si presentan una relación baja o inexistente con el resto de subprocesos usados en la caracterización (p-valor < 0.25).

Dado que la extensión del análisis completo es considerable, se detallan en el documento principal de esta tesis únicamente los resultados más relevantes obtenidos de los dos procesos mencionados anteriormente. El análisis completo y detallado puede consultarse en el Anexo 10 de la versión digital de este documento.

4.1.3.1 – Proteínas diferenciales obtenidas en el análisis del secretoma.

Un total de 75 proteínas diferencialmente expresadas obtenidas del sobrenadante de las MSCs infectadas con el adenovirus oncolítico ICOVIR-5 procedentes tanto de pacientes respondedores como no respondedores mostraron una fuerte relación con los siguientes procesos:

- Respuesta inmune frente al virus (71 proteínas).
- Replicación viral (24 proteínas).

En cuanto al proceso “*Respuesta inmune frente al virus*”, un total de 6 proteínas se relacionaron fuertemente con al menos 6 subprocesos diferentes implicados en este proceso global. Estas proteínas son: IL-6, IL-10, IL-6R, IL-4, CCL2 y FGA (**Tabla 8**).

ID	En respondedores:	Efectora	ANN score	Procesos relacionados	Secretada
IL-6	Aumentado	Sí	77.68	Respuesta de defensa frente al virus	Sí
		No	76.79	Regulación de la respuesta de defensa frente al virus	
		Sí	87.23	Regulación de la producción de quimioquinas	
		Sí	74.62	Regulación de la respuesta inmune adaptativa	
		Sí	80.55	Regulación de la inmunidad mediada por células T	
		No	78.9	Regulación de la citotoxicidad mediada por células T	
		Sí	80.15	Regulación de la inmunidad mediada por inmunoglobulinas	
		Sí	79.96	Quimiotaxis leucocitaria	
		Sí	78.69	Regulación de la quimiotaxis leucocitaria	
IL-10	Aumentado	No	75.27	Regulación de la respuesta de defensa frente al virus	Sí
		Sí	88.98	Regulación de la producción de quimioquinas	
		Sí	75.37	Regulación de la respuesta inmune adaptativa	
		No	77.88	Regulación de la inmunidad mediada por células T	
		No	75.27	Regulación de la respuesta inmune Th helper tipo I	
		Sí	82.03	Regulación de la inmunidad mediada por células B	
		Sí	89.46	Regulación de la inmunidad mediada por inmunoglobulinas	
		Sí	91.76	Quimiotaxis leucocitaria	
IL-6R	Disminuido		85.67	Regulación de la producción de quimioquinas	Sí
		Sí	81.76	Regulación de la respuesta inmune adaptativa	
			90.5	Regulación de la respuesta inmune Th helper tipo I	
		Sí	79.96	Quimiotaxis leucocitaria	

IL-4	Disminuido	No	75.34	Regulación de la producción de quimioquinas	Sí
		Sí	75.03	Regulación de la respuesta inmune adaptativa	
		No	77.25	Regulación de la inmunidad mediada por células T	
		Sí	83.84	Regulación de la inmunidad mediada por células B	
		Sí	90.72	Regulación de la inmunidad mediada por inmunoglobulinas	
		Sí	77.70	Regulación de la diferenciación leucocitaria	
		Sí	76.4	Regulación de la diferenciación de las células T	
CCL2	Aumentado	Sí	76.45	Respuesta de IFN gamma	Sí
		Sí	79.49	Respuesta a IFN gamma	
		Sí	93.32	Extravasación celular	
		Sí	77.45	Quimiotaxis leucocitaria	
		Sí	76.01	Regulación de la migración leucocitaria	
		Sí	80.03	Regulación de la quimiotaxis leucocitaria	
FGA	Aumentado	Sí	90.13	Señalización por receptor Toll-like	Sí
		No	76.54	Respuesta a IFN tipo I	
		No	74.92	Regulación de la producción de IFN tipo I	
		No	78.31	Respuesta de IFN gamma	
		No	74.70	Respuesta a IFN gamma	
		No	75.72	Regulación de la respuesta inmune adaptativa	
		No	74.65	Replicación de ADN	

Tabla 8: Proteínas diferencialmente expresadas y secretadas por los pacientes para el proceso “Respuesta inmune frente al virus”. Las proteínas detalladas en esta lista mostraron una relación fuerte con dicho proceso. Se detallan, de izquierda a derecha: el nombre de la proteína; su abundancia en el grupo de pacientes respondedores; si la proteína tiene un papel efector en el proceso descrito; el valor del score para el análisis de ANNs; la descripción de los subprocesos específicos en los que interviene dicha proteína; y, por último, si dicha proteína es secretada o no.

En cuanto al proceso “*Replicación viral*”, un total de 5 proteínas se relacionaron fuertemente con al menos 2 subprocesos implicados en este proceso global. Estas proteínas son: GMNN, MMP-12, FGB, ICAM1 y TNFRSF10A (**Tabla 9**).

ID	En respondedores:	Efectora	ANN score	Procesos relacionados	Secretada
GMNN	Aumentado	No	78.07	Señalización por receptor Toll-like	No
		No	73.35	Ciclo viral	
		Sí	83.07	Replicación de ADN	
		Sí	78.49	Regulación de la replicación de ADN	
MMP-12	Disminuido	Sí	90.21	Modulación viral de los procesos celulares	Sí
		Sí	80.68	Respuesta celular al virus	
FGB	Aumentado	Sí	81.03	Señalización por receptor Toll-like	Sí
		No	74.93	Respuesta a IFN tipo I	
		No	79.71	Replicación de ADN	
ICAM1	Disminuido	Sí	78.35	Unión virus-célula huésped	Sí
		No	79.47	Replicación de ADN	
TNFRSF10A	Aumentado	No	75.77	Replicación de ADN	No
		No	74.10	Regulación de la transcripción	

Tabla 9: Proteínas diferencialmente expresadas y secretadas por los pacientes para el proceso “Replicación viral”. Las proteínas detalladas en esta lista mostraron una relación fuerte con dicho proceso. Se detallan, de izquierda a derecha: el nombre de la proteína; su abundancia en el grupo de pacientes respondedores; si la proteína tiene un papel efector en el proceso descrito; el valor del score para el análisis de ANN; la descripción de los subprocesos específicos en los que interviene dicha proteína; y, por último, si dicha proteína es secretada o no.

4.1.3.2 – Genes diferenciales obtenidos en el análisis del transcriptoma.

Un total de 44 genes diferencialmente expresados detectados en el transcriptoma de las MSCs infectadas con el adenovirus oncolítico ICOVIR-5 procedentes tanto de pacientes respondedores como no respondedores han mostrado una relación fuerte con los siguientes procesos:

- Respuesta inmune frente al virus (29 proteínas).
- Replicación viral (26 proteínas).

En cuanto al proceso “*Respuesta inmune frente al virus*”, un total de 5 genes codificantes de otras tantas proteínas se relacionaron fuertemente con al menos 3 subprocesos diferentes implicados en este proceso global: TRAF3, MAVS, PCBP2, FASN y NDRG1 (**Tabla 10**).

En cuanto al proceso “*Replicación viral*”, un total de 8 genes codificantes de otras tantas proteínas se relacionaron fuertemente con al menos 2 subprocesos implicados en este proceso global: CHMP2A, CLEC5A, XBP1, BMPR1B, MAVS, RAB29, TRAF3 y MEMO1 (**Tabla 11**).

4.1.4 – Validación de los candidatos obtenidos en los estudios del transcriptoma y del secretoma.

Una vez identificadas las moléculas implicadas en el comportamiento biológico diferente del MTA entre ambos grupos de pacientes, en relación a la respuesta celular a la infección y a la permisividad para la replicación adenoviral, se procedió a la validación de las mismas. Para ello se utilizó una cohorte independiente de pacientes tratados con el MTA *Celyvir* (ver sección Pacientes).

4.1.4.1 – Cuantificación de la replicación viral y validación de los genes responsables de la misma.

La validación se realizó mediante cuantificación de la producción de partículas virales a los 3 días de la infección con ICOVIR-5 (ver Metodología). Este estudio reveló que no existían diferencias en la capacidad replicativa del virus bajo estas condiciones, tres días después de la infección (**Figura 13A**). A la vista de los resultados obtenidos y de manera complementaria, se realizó también la cuantificación por PCR cuantitativa de los genes candidatos en el proceso “*Replicación viral*” (**Figura 13B**). De todos los genes candidatos, únicamente los genes MAVS y BMPR1B confirma los resultados obtenidos en el análisis del transcriptoma para dicho proceso.

Los genes MAVS y TRAF3 no se muestran en esta figura, pero sí el siguiente proceso.

ID	En respondedores:	Efectora	ANN score	Procesos relacionados
TRAF3	Disminuido	Sí	84.19	Regulación de la respuesta de defensa frente al virus
		Sí	74.32	Receptor de reconocimiento de patrón viral
		Sí	84.18	Señalización por receptor Toll-like
		No	75.06	Regulación de la señalización por receptor Toll-like
		Sí	74.46	Respuesta a IFN tipo I
		Sí	79.08	Regulación de la producción de IFN tipo I
		No	74.15	Regulación de la diferenciación de las células T
		No	77.06	Entrada viral en la célula huésped
MAVS	Disminuido	Sí	90.73	Regulación de la respuesta de defensa frente al virus
		Sí	77.38	Respuesta de defensa frente al virus
		Sí	77.67	Regulación de la ruta de señalización mediada por IFN tipo I
		Sí	88.63	Regulación de la producción de IFN tipo I
		Sí	92.29	Regulación de la producción de quimioquinas
PCBP2	Disminuido	Sí	82.50	Regulación de la respuesta de defensa frente al virus
		Sí	81.04	Respuesta de defensa frente al virus
		Sí	82.13	Respuesta a IFN tipo I
		Sí	82.46	Regulación de la producción de IFN tipo I
FASN	Disminuido	No	78.50	Señalización por receptor Toll-like
		No	77.39	Regulación de la producción de IFN tipo I
		No	74.14	Respuesta a IFN gamma
NDRG1	Disminuido	No	77.28	Respuesta a IFN tipo I
		No	78.37	Regulación de la respuesta inmune adaptativa
		No	74.30	Diferenciación leucocitaria
		No	81.59	Replicación de ADN

Tabla 10: Genes diferencialmente expresados por los pacientes para el proceso “Respuesta inmune frente al virus”. Los genes indicados en esta lista mostraron una relación fuerte con dicho proceso. Se detallan, de izquierda a derecha: el nombre del gen; su abundancia en el grupo de pacientes respondedores; si el gen tiene un papel efector en el proceso descrito; el valor del *score* para el análisis de ANNs; y, por último, la descripción de los subprocesos

ID	En respondedores:	Efectora	ANN score	Procesos relacionados
CHMP2A	Aumentado	No	75.01	Ciclo viral
		Sí	77.50	Regulación del ciclo viral
		Sí	88.52	Ensamblaje viral
		Sí	85.04	Regulación de la liberación vírica de la célula huésped
CLEC5A	Aumentado	Sí	80.38	Ciclo viral
		Sí	85.74	Entrada viral en la célula huésped
XBP1	Aumentado	Sí	81.54	Regulación de la inmunidad mediada por inmunoglobulinas
		No	74.49	Ciclo viral
		No	77.73	Regulación de la traducción
BMPR1B	Aumentado	No	75.93	Ciclo viral
		No	75.53	Replicación de ADN
MAVS	Disminuido	Sí	82.30	Regulación del ciclo viral
		No	77.23	Respuesta celular al virus
RAB29	Disminuido	Sí	80.00	Ciclo viral
		No	78.42	Regulación de la transcripción viral
TRAF3	Disminuido	No	77.06	Entrada viral en la célula huésped
		No	76.78	Respuesta celular al virus
MEMO1	Disminuido	No	74.24	ARN de interferencia
		No	75.19	Regulación de la transcripción viral
		No	76.01	Regulación de la traducción

Tabla 11: Genes diferencialmente expresados por los pacientes para el proceso “Replicación viral”. Los genes indicados en esta lista mostraron una relación fuerte con dicho proceso. Se detallan, de izquierda a derecha: el nombre del gen; su abundancia en el grupo de pacientes respondedores; si el gen tiene un papel efector en el proceso descrito; el valor del score para el análisis de ANNs; y, por último, la descripción de los subprocesos específicos en los que interviene dicho gen.

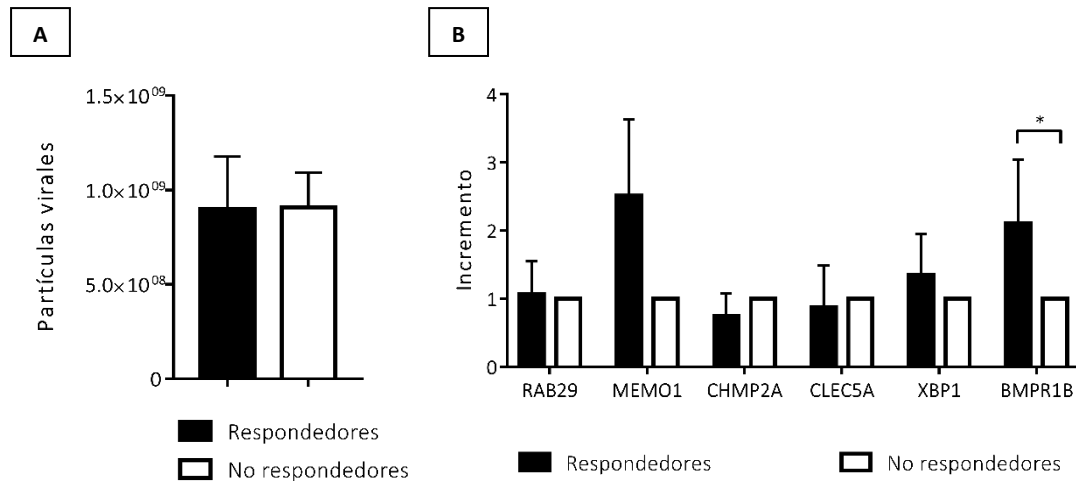


Figura 13: Validación de los candidatos implicados en el proceso “*Replicación viral*”. A) Cuantificación de la producción de partículas virales de cada grupo de pacientes tres días después de la infección. B) Expresión relativa de los genes diferencialmente expresados por el análisis ANNs para el proceso “*Replicación viral*”

4.1.4.2 – Validación de genes candidatos responsables de las diferencias en la respuesta celular innata a la infección.

Se realizó PCR cuantitativa para los genes FASN, MAVS, NDRG1, PCBP2 y TRAF3. Los resultados revelaron que sólo MAVS y NDRG1 cumplen esta condición (**Figura 14**).

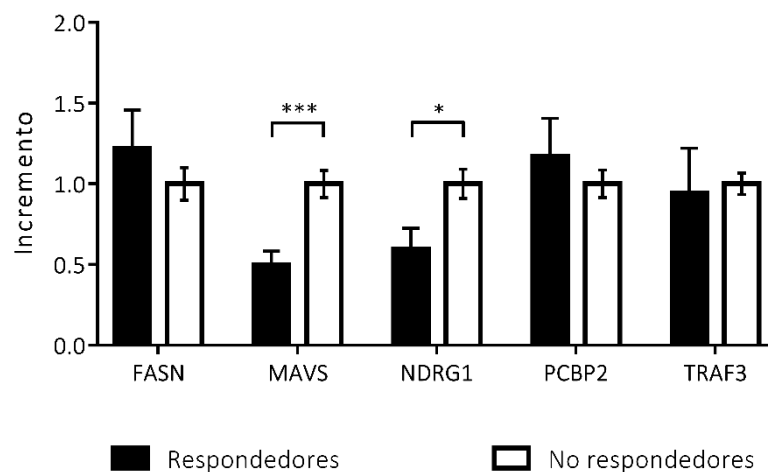


Figura 14: Expresión relativa de los genes diferencialmente expresados por el análisis ANNs para el proceso “*Respuesta inmune frente al virus*” (MAVS, $p \leq 0,001$; NDRG1, $p \leq 0.0116$).

4.1.4.3 – Cuantificación de candidatos del secretoma.

Tres de los analitos (sIL-6R, IL-10 e IL-4) quedaron por debajo del umbral de detección de la técnica de análisis. Los otros dos analitos (IL-6 y MCP-1) mostraron unos valores significativamente inferiores en el grupo de los no respondedores (**Figura 15**).

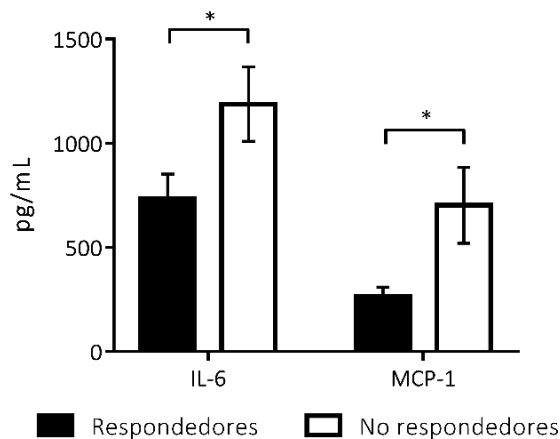


Figura 15: Cuantificación de las proteínas diferencialmente secretadas en el sobrenadante de los cultivos de *Celyvir*. De las cinco proteínas analizadas, únicamente se detectaron IL-6 y MCP-1 con los ensayos de Multiplex que utilizamos ($p \leq 0.05$).

4.1.5 – Representación gráfica de los procesos con CYTOSCAPE.

El software *Cytoscape* permite representar gráficamente las relaciones entre las moléculas de interés. Para cada proceso se ha representado cada una de las proteínas o genes diferencialmente expresados y sus relaciones con otras proteínas o rutas cercanas, que no tienen por qué ser necesariamente pertenecientes al mismo grupo de estudio. En algunos casos, las moléculas interactúan con proteínas o genes destacados en otros procesos.

4.1.5.1 – Transcriptoma: Respuesta inmune frente al virus: NDRG1 y MAVS (Figuras 16 y 17).

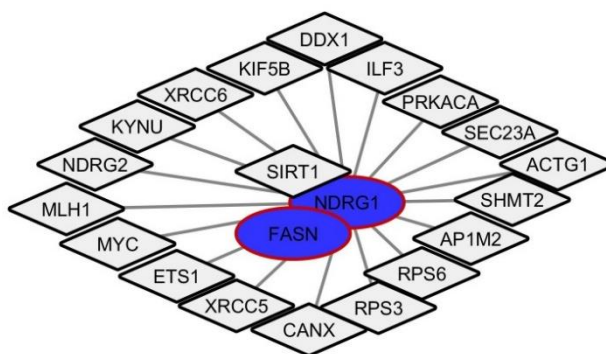


Figura 16: Red neuronal representando las conexiones de NDRG1 con otras proteínas y genes involucrados en el proceso descrito.

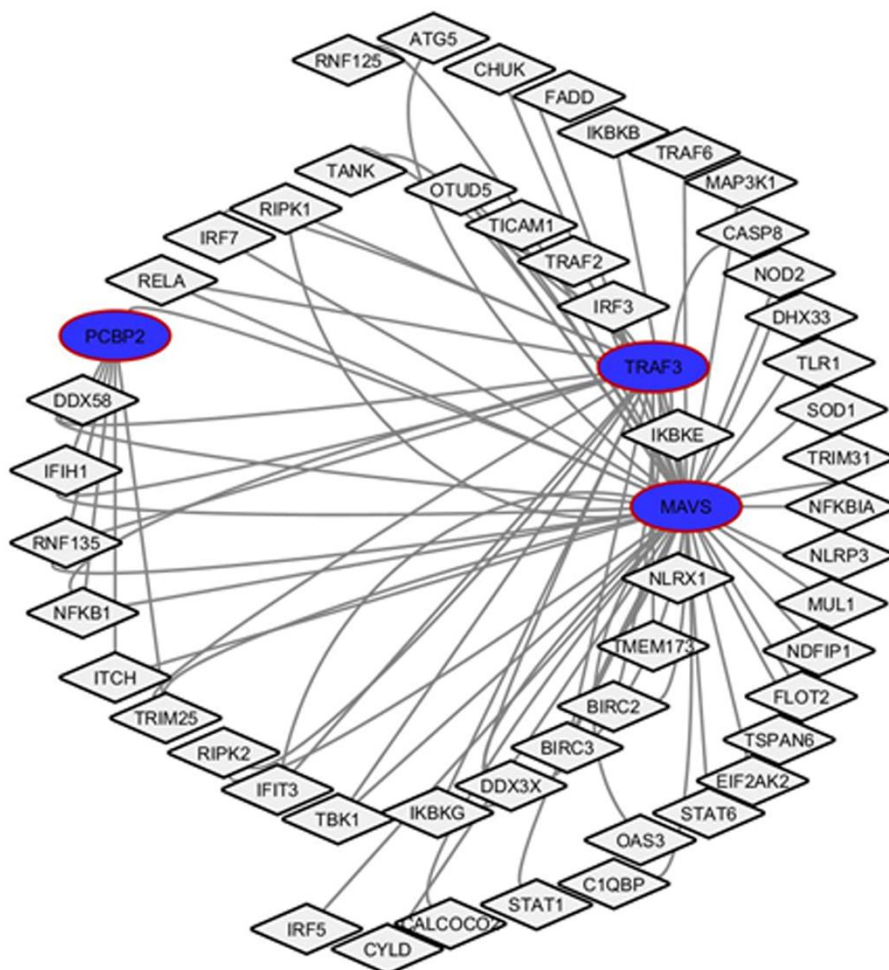


Figura 17: Red neuronal representando las conexiones de MAVS con otras proteínas y genes involucrados en el proceso descrito.

4.1.5.2 – Secretoma: Respuesta inmune frente al virus: IL-6 y CCL2 (Figuras 18 y 19).

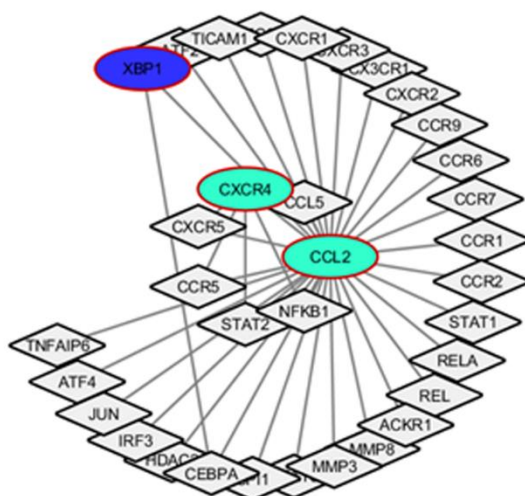


Figura 18: Red neuronal representando las conexiones de CCL2 (MCP-1) con otras proteínas y genes involucrados en el proceso descrito.

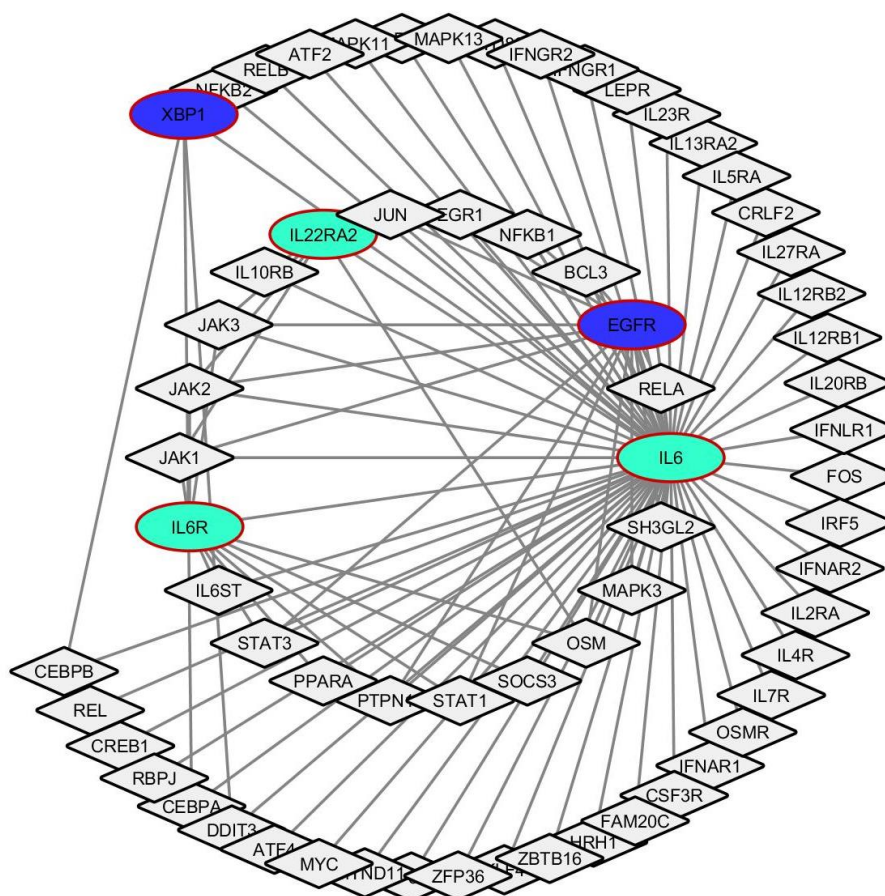


Figura 19: Red neuronal representando las conexiones de IL-6 con otras proteínas y genes involucrados en el proceso descrito.

4.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de *Celyvir*.

Se estudió el caso clínico de una paciente que después del diagnóstico de neuroblastoma metastásico recibió tres líneas de terapia, con progresión después de cada una de ellas. Las infusiones semanales de *Celyvir* como uso compasivo en monoterapia se siguió de estabilización de la enfermedad en la primera evaluación (después de los primeros dos meses). Los recuentos de linfocitos T en sangre periférica aumentaron constantemente desde los niveles basales bajos. Desde un punto de vista clínico, la mejora de su estado general durante el primer año del tratamiento con *Celyvir* fue notable. Inició terapia pálida, cansada, triste y anoréxica. Después de cuatro meses, ya no parecía enferma y ganó 2.5 kg. Su índice de Lansky mejoró de 50 a 90. El examen clínico se volvió normal (excepto la masa abdominal). *Celyvir* se suspendió después de 12 meses y luego se administraron infusiones de interleuquina-2 (IL-2), a dosis de 6×10^6 U cada una, para estimular *in vivo* la respuesta inmune antitumoral. Los recuentos de células sanguíneas disminuyeron con este tratamiento, por lo que se suspendió la administración de IL-2 después de 2 meses y luego se reanudaron las infusiones de *Celyvir*. Un aumento inicial de linfocitos T circulantes siguió a la reinfusión de *Celyvir* y duró 3 meses, después de lo cual la enfermedad se reactivó y progresó hasta el fallecimiento de la paciente, a los 22 meses del inicio del tratamiento con *Celyvir*. En esta paciente obtuvimos biopsias del tumor primario antes, durante y en la etapa final de la terapia con *Celyvir*, lo que nos permitió estudiar en profundidad los mecanismos del control inicial ejercido por la terapia sobre el tumor, la adaptación del mismo y su escape final.

4.2.1 – Células inmunes infiltrantes del tumor durante la evolución de la enfermedad.

4.2.1.1 – Estimación de la actividad celular del tumor por inmunohistoquímica.

Inicialmente nuestro grupo reportó los resultados de los estudios anatomopatológicos en parafina obtenidas de las biopsias de la paciente, así como las citometrías procedentes del tejido fresco¹¹⁴. Estos resultados mostraron la presencia de células mieloides y linfoides infiltrantes en las biopsias obtenidas al diagnóstico, durante el tratamiento con *Celyvir* (durante la que hubo una estabilización), y en la fase final de la enfermedad. La mayoría de las poblaciones inmunes estaban presentes en cada uno de estos puntos, pero el marcaje con Ki67 (indicador de proliferación celular) mostró un incremento de la actividad de los TILs en el interior de las estructuras nodulares del tumor únicamente durante la fase de estabilización, lo que sugiere que el efecto clínico en ese momento se relacionaba con una respuesta activa de la inmunidad intratumoral. Por el contrario, la mayoría de las señales positivas a Ki67 durante la fase de

progresión se correspondían con la actividad de las células tumorales, mientras que en esa misma fase la mayoría de los TILeUs aparecían mayormente inactivos (**Figura 20**).

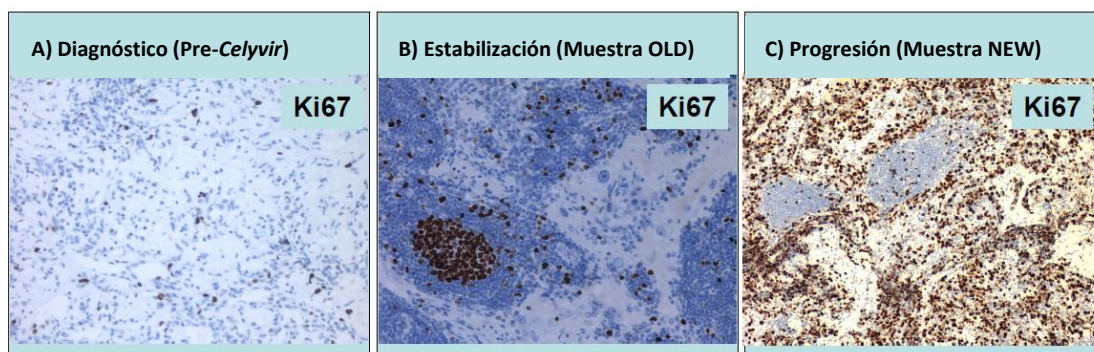


Figura 20: Imágenes del marcaje con Ki67 de las biopsias tumorales de la paciente. **A)** Marcaje en el momento del diagnóstico. **B)** Marcaje de la biopsia en el momento de la estabilización clínica en respuesta al tratamiento con *Celyvir*. **C)** Marcaje de la biopsia cuando la enfermedad se encontraba en progresión, tras recibir el tratamiento con *Celyvir*.

4.2.1.2 – Estimación de la pureza tumoral.

Se realizó secuenciación masiva del transcriptoma de muestras tumorales obtenidas durante la estabilización de la enfermedad por el tratamiento con *Celyvir* (muestra OLD) y en el momento de progresión final (muestra NEW). Los resultados crudos de secuenciación se analizaron con diferentes herramientas bioinformáticas. Se utilizó el algoritmo ESTIMATE (*Estimation of STromal and Immune cells in MAlignant Tumor tissues using Expression data*)¹⁴² para predecir la pureza del tumor, así como la presencia de células estromales o infiltrantes en el tejido tumoral. El algoritmo ESTIMATE analiza tres “scores” o puntuaciones que aportan información sobre la composición del tumor a nivel celular a partir de la ratio célula estromal / célula inmune:

- **ESTIMATEScore:** Identifica la pureza tumoral.
- **StromalScore:** Cuantifica la presencia de estroma en el tejido tumoral.
- **ImmuneScore:** Representa la infiltración de las células inmunes en el tejido tumoral.

Los datos revelaron que durante la fase de estabilización clínica la ratio célula estromal / célula inmune era significativamente mayor en los tres tipos de análisis si se comparaba con la fase de progresión de la enfermedad. Las diferencias no llegaron a ser significativas para el StromalScore pero sí lo fueron para el ImmuneScore, lo que indica que la mayor parte de las diferencias detectadas en el ESTIMATEScore entre ambas muestras se deben al componente inmune del tumor (**Figura 21**).

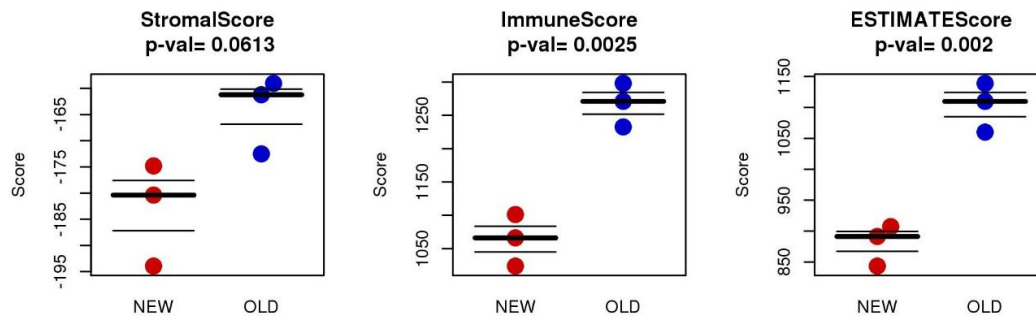


Figura 21. Gráficas generadas por el algoritmo ESTIMATE para el análisis de las poblaciones celulares para las muestras analizadas de la paciente.

4.2.1.3 – Estimación de las poblaciones inmunes presentes en el tumor mediante diferentes algoritmos.

4.2.1.3.1 – Algoritmo ESTIMATE.

El algoritmo ESTIMATE también proporcionó datos acerca de qué tipo de poblaciones inmunes infiltraban el tejido tumoral a partir de los datos obtenidos por secuenciación de ARN (RNA-Seq). Este análisis reveló que la diferencia significativa revelada por el ImmuneScore ($p = 0.0025$) durante la estabilización de la enfermedad se debía principalmente a las siguientes subpoblaciones inmunes (**Figura 22**):

- los linfocitos B (score: 3.5 vs. 0.5; $p = 0$).
- los linfocitos T (score: 2.2 vs. 0.55; $p = 7e-04$).
- las células CD8 (score: 3 vs. 2.8; $p = 0.0313$).
- las células NK (score: 0.6 vs. 0.55; $p = 0.0241$).
- las células dendríticas mieloides (score: 1.8 vs. 1.1; $p = 2e-04$).

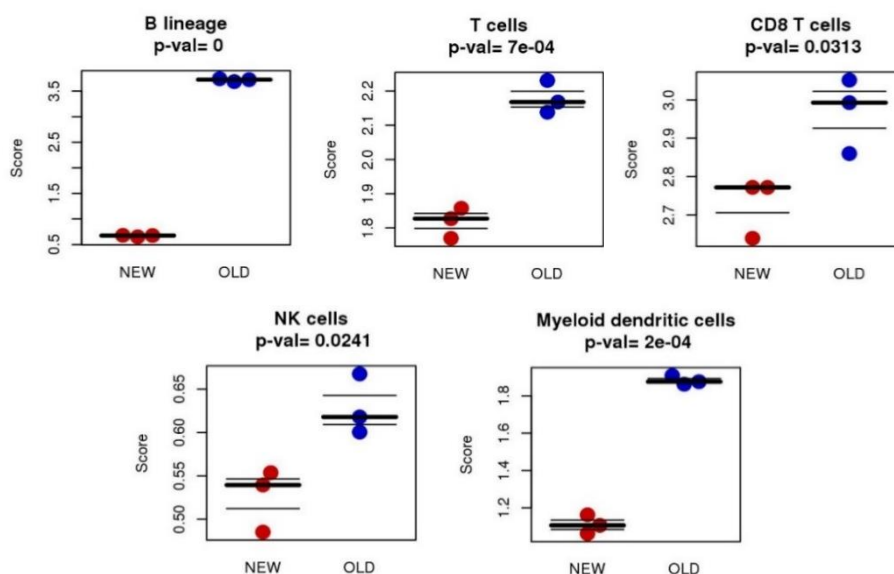


Figura 22. Resultados del análisis mediante ESCORE para cada una de las poblaciones celulares identificadas en el tumor gracias al algoritmo.

Por el contrario, los monocitos eran significativamente más abundantes durante la progresión de la enfermedad (*score*: 3.2 vs. 2.9; $p = 5e-04$) si se comparaban con la estabilización de la enfermedad. Los *scores* correspondientes a la presencia de células endoteliales y fibroblastos eran menores durante la progresión que durante la estabilización de la enfermedad (**Figura 23**).

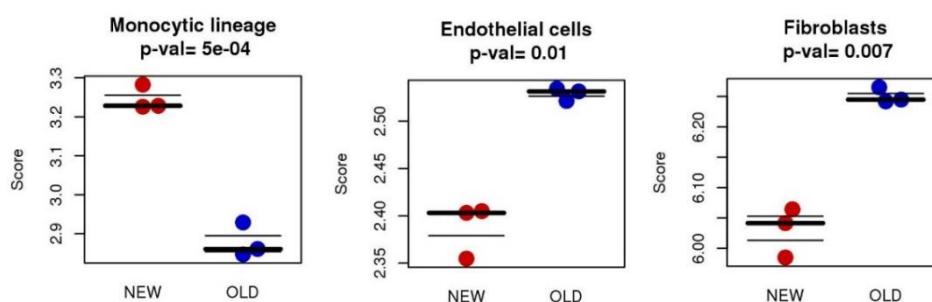


Figura 23. Resultados del análisis mediante el algoritmo ESCORE para las poblaciones celulares compuestas por monocitos, células endoteliales y fibroblastos.

4.2.1.3.2 – Algoritmo QuanTiSeq.

La estimación de las poblaciones inmunes también se hizo utilizando el algoritmo QuanTiSeq. Al igual que el algoritmo ESTIMATE, es capaz de inferir la identidad de poblaciones inmunes a partir de los datos crudos que proporciona el RNA-Seq, si bien las poblaciones que identifica son diferentes. Los resultados del QuanTiSeq confirmaron los resultados obtenidos por ESTIMATE (**Figura 24**).

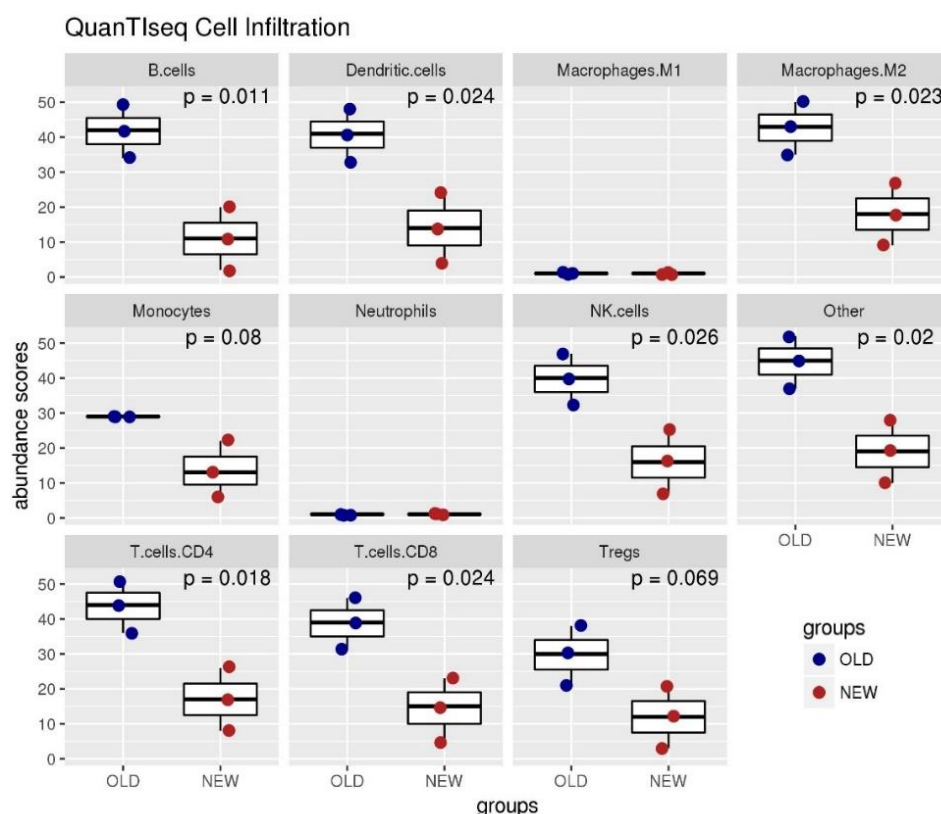


Figura 24. Subpoblaciones celulares inmunes inferidas mediante el algoritmo QuanTiSeq a partir de los datos de RNA-Seq para cada una de las muestras de la paciente.

La muestra tumoral en el momento de la estabilización (OLD) presenta un enriquecimiento estadísticamente significativo de células B ($p = 0.011$), células dendríticas ($p = 0.024$), células NK ($p = 0.026$) y células CD8+ ($p = 0.024$).

Otras poblaciones que el QuanTiSeq identificó y aparecieron más abundantes durante la estabilización de la enfermedad fueron los macrófagos de tipo M2 ($p = 0.023$) y los linfocitos CD4 cooperador ($p = 0.018$) y los linfocitos T CD4+ reguladores (Tregs) de forma casi significativa ($p = 0.06$).

4.2.1.3.3 – CIBERSORT.

La última herramienta utilizada para estimar las poblaciones inmunes en el contexto tumoral fue CIBERSORT. Esta herramienta ofrece un gráfico muy visual que representa el porcentaje relativo acerca de la abundancia de las distintas subpoblaciones inmunes infiltrantes del tumor en ambos momentos del tratamiento (**Figura 25**). CIBERSORT identificó al conjunto de linfocitos B (compuesto tanto por células B *naïve* como por células B de memoria) como la población inmune dominante en el microambiente tumoral en el momento de la estabilización clínica (muestra OLD). En ese mismo instante, los linfocitos T CD4+ predominaban sobre los linfocitos T CD8+ en el conjunto de los TILs, mientras que los macrófagos con fenotipo M2 constituían la principal población entre las células mieloides.

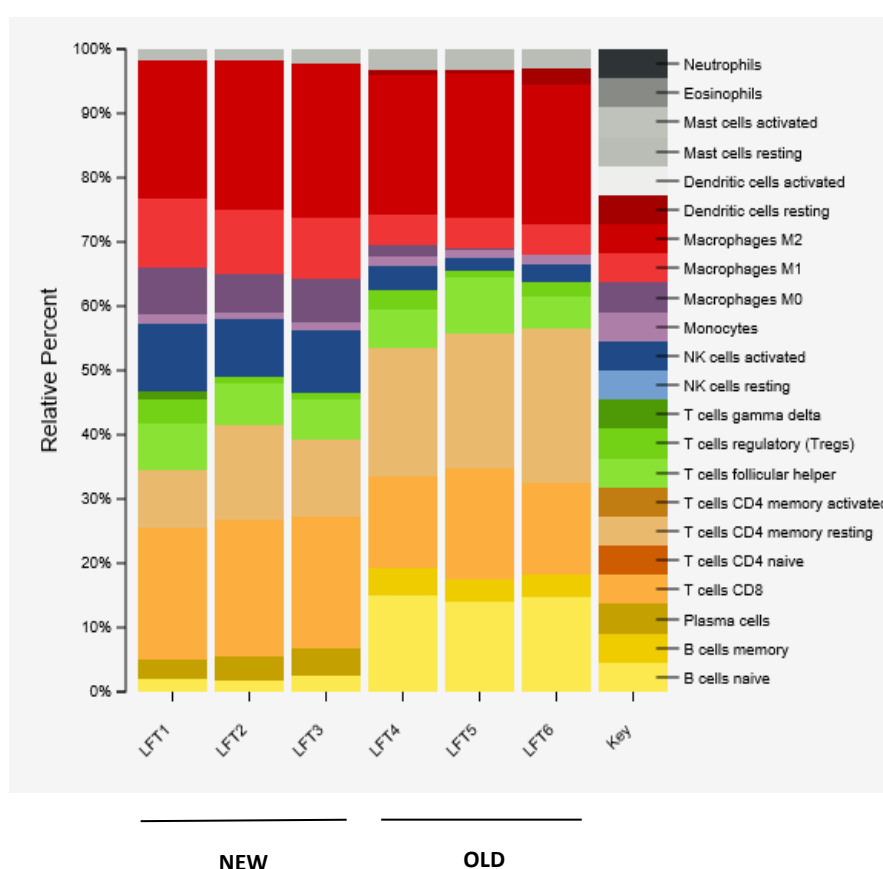


Figura 25: Distintas subpoblaciones inmunes inferidas por CIBERSORT entre ambos estadios de la enfermedad representadas como porcentaje relativo en el total del tumor. Las muestras LFT1, LFT2 y LFT3 se corresponden con los replicados técnicos pertenecientes al estado de progresión (muestra NEW). Las muestras LFT4, LFT5 y LFT6 son los replicados técnicos pertenecientes a la estabilización de la enfermedad (muestra OLD).

Por el contrario, durante la progresión de la enfermedad las células plasmáticas aparecían como el componente principal de la población de linfocitos B, mientras que los linfocitos T CD8+ predominaban esta vez sobre los linfocitos T CD4+. Las células NK

activadas también aparecían más representadas en el momento de la progresión, mientras que los macrófagos M2 seguían predominando entre el componente mieloide, con proporciones crecientes de macrófagos fenotipo M0 y M1.

CIBERSORT también reveló que las células dendríticas no activadas (*DCs resting*) aparecen durante la estabilización, pero no durante la progresión. En ninguna de las muestras se detectaron neutrófilos, eosinófilos o células dendríticas activadas.

4.2.1.3.4 – Proporción de la infiltración leucocitaria en las muestras tumorales a partir de los distintos algoritmos.

Los resultados de los tres análisis llevados a cabo a partir de los datos del RNA-Seq con las herramientas ESTIMATE, QuantIseq y CIBERSORT indican una mayor infiltración y actividad de los linfocitos en el microambiente tumoral durante la estabilización de la enfermedad, que evolucionó o cambió hacia un estado predominantemente mieloide en el momento en que el tumor progresó y escapó del control del adenovirus oncolítico administrado mediante *Celyvir* (Figura 26).

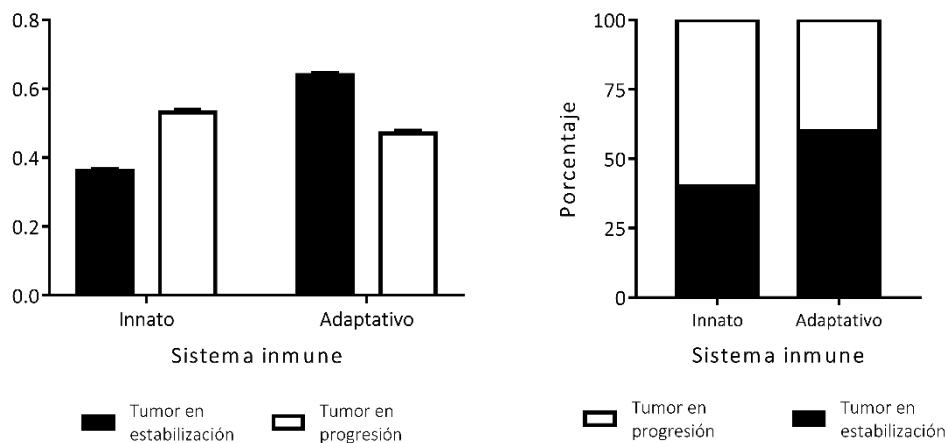


Figura 26. Gráficas que muestran la cantidad relativa y el porcentaje de cada tipo de inmunidad (adaptativa o innata) en ambas muestras tumorales, en distintos momentos de la enfermedad.

Para completar el estudio de infiltración inmune, se realizaron análisis adicionales relacionados con diversas características y funciones de las células inmunes:

Actividad de las quimioquinas en las muestras del tumor. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras salvo en aquellas quimioquinas relacionadas con los linfocitos B ($p = 0.0016$) y las DCs plasmacitoides ($p = 0.05$), ambas significativamente más elevadas durante la estabilización de la enfermedad. Las DCs convencionales únicamente tendieron a presentarse como más elevadas durante la estabilización ($p = 0.34$). Aunque las diferencias no fueron

significativas, durante la progresión de la enfermedad la abundancia de monocitos y células T tendía a ser mayor si se comparaba con la enfermedad durante la estabilización ($p = 0.15$).

Cada una de las seis poblaciones fue analizada en mayor profundidad, y se reveló que las características funcionales o de quimiotaxis para determinados tipos celulares se encontraban significativamente enriquecidas en un grupo o en otro. Por ejemplo, las quimioquinas relacionadas con la atracción de los linfocitos B eran más abundantes durante la estabilización (**Figuras 27 a 30**).

Estado de activación de los linfocitos. Los marcadores de activación crónica (asociada a agotamiento funcional) para los linfocitos T (HAVCR2, LAG3, TIGIT) estaban más expresados durante la progresión. Estos linfocitos T también expresaban mayores niveles de granzimas (GZMA, GZMB) y perforinas (PRF1) (**Figuras 31 y 32**).

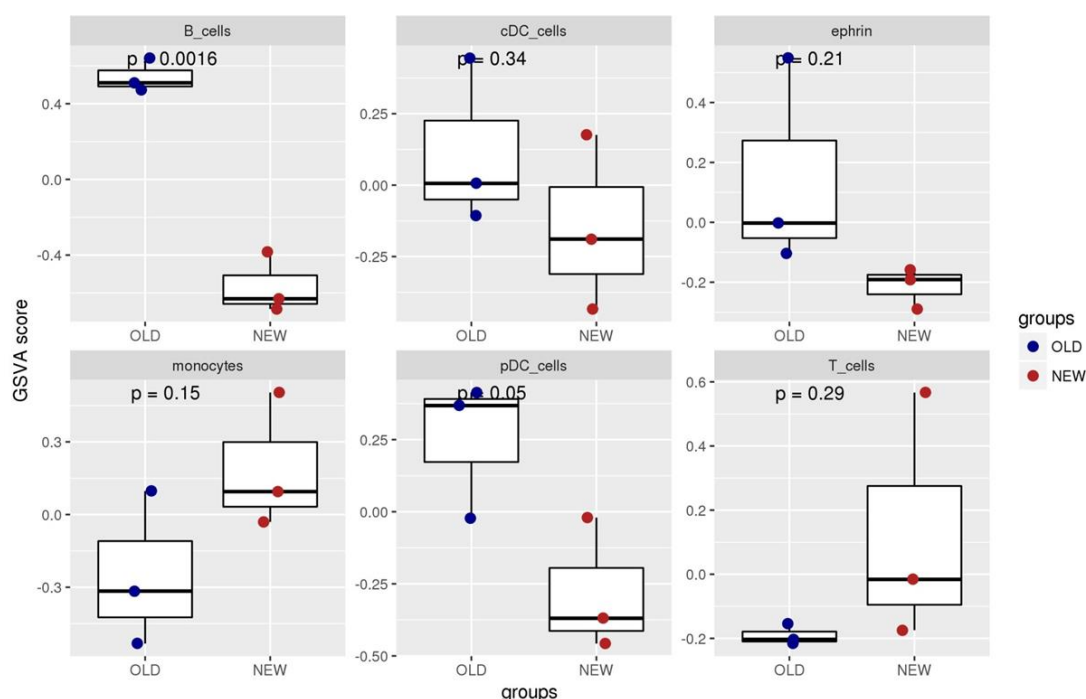


Figura 27. Análisis de los genes relacionados con las diferentes poblaciones inmunes de ambas muestras.).

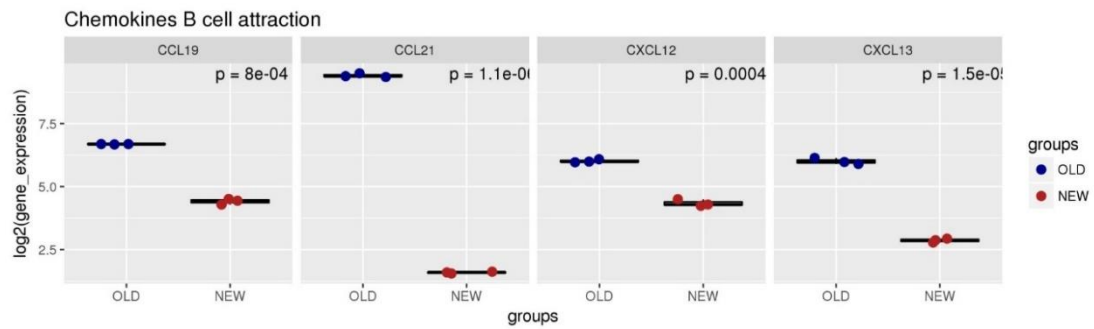


Figura 28. Quimioquinas relacionadas con la atracción de células B.

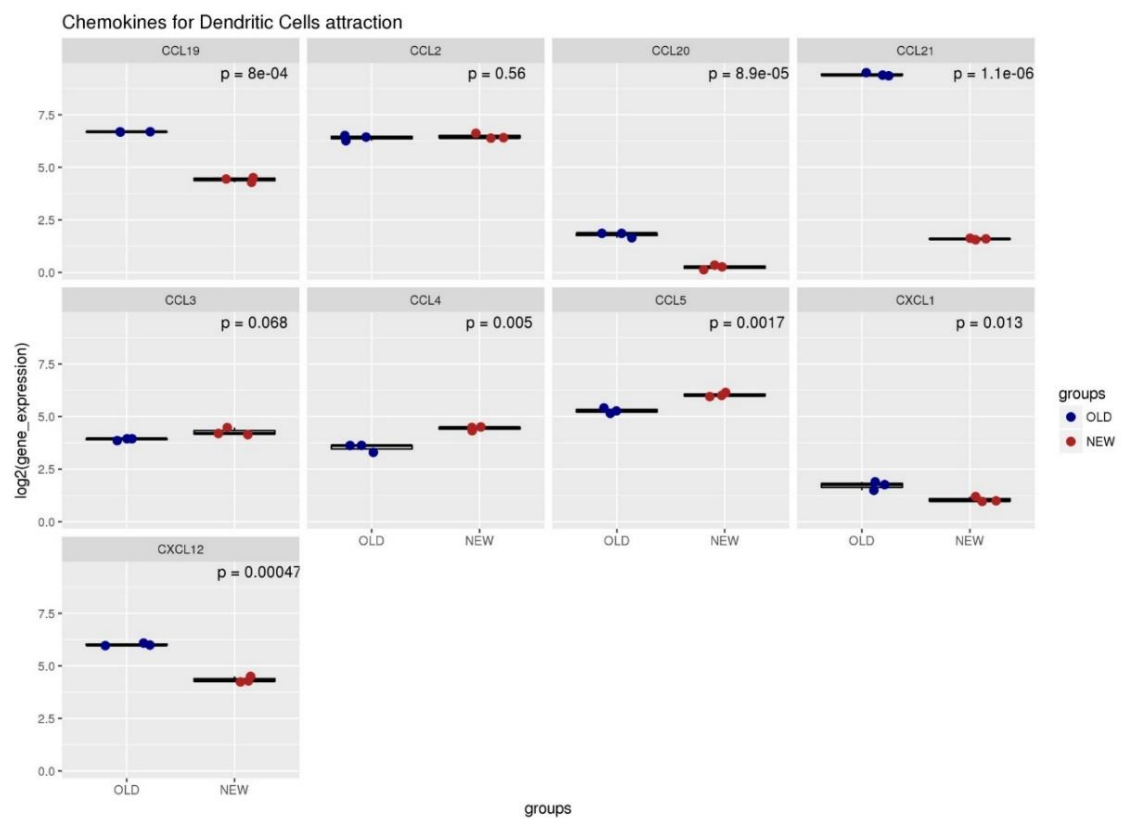


Figura 29. Quimioquinas relacionadas con la atracción de células dendríticas.

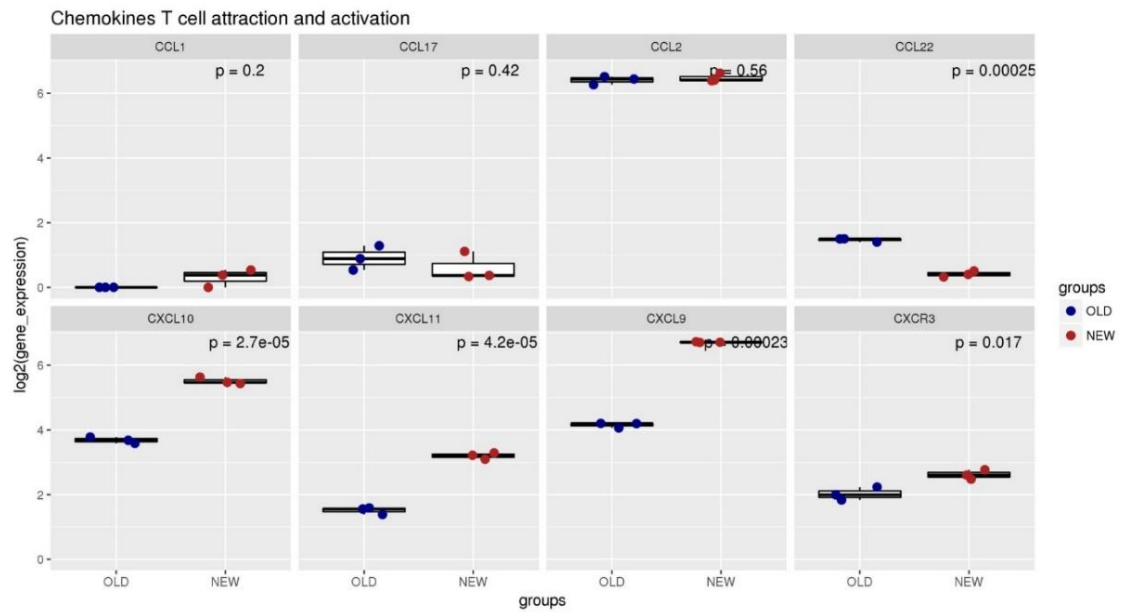


Figura 30. Quimioquinas relacionadas con la atracción y activación de células T.

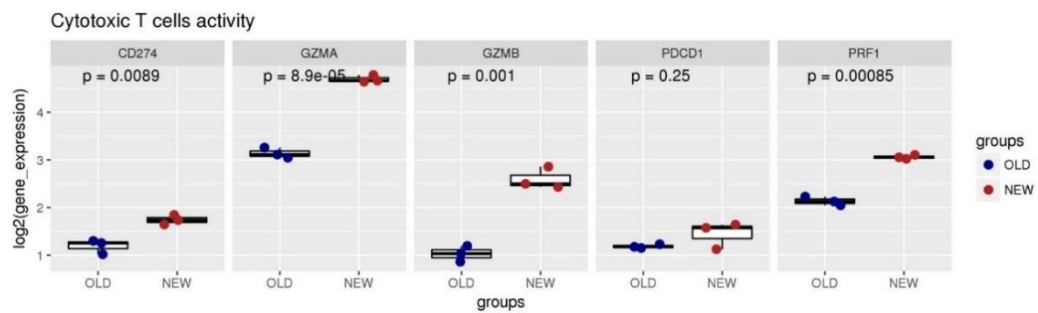


Figura 31. Moléculas relacionadas con la citotoxicidad de células T.

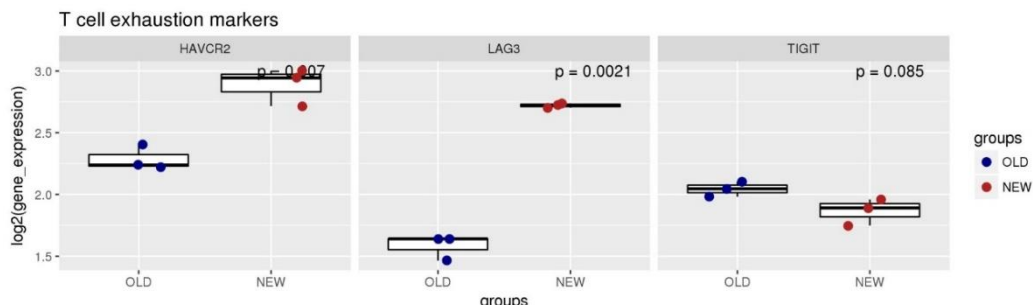


Figura 32. Marcadores de agotamiento de células T.

4.2.2 – Repertorio clonal de linfocitos T infiltrantes del tumor durante la evolución de la enfermedad.

La secuenciación de los genes que codifican para las cadenas de los TCR- β mostró que existía un mayor número de reordenamientos clonales en la muestra correspondiente a la progresión final de enfermedad (**Figura 33**).

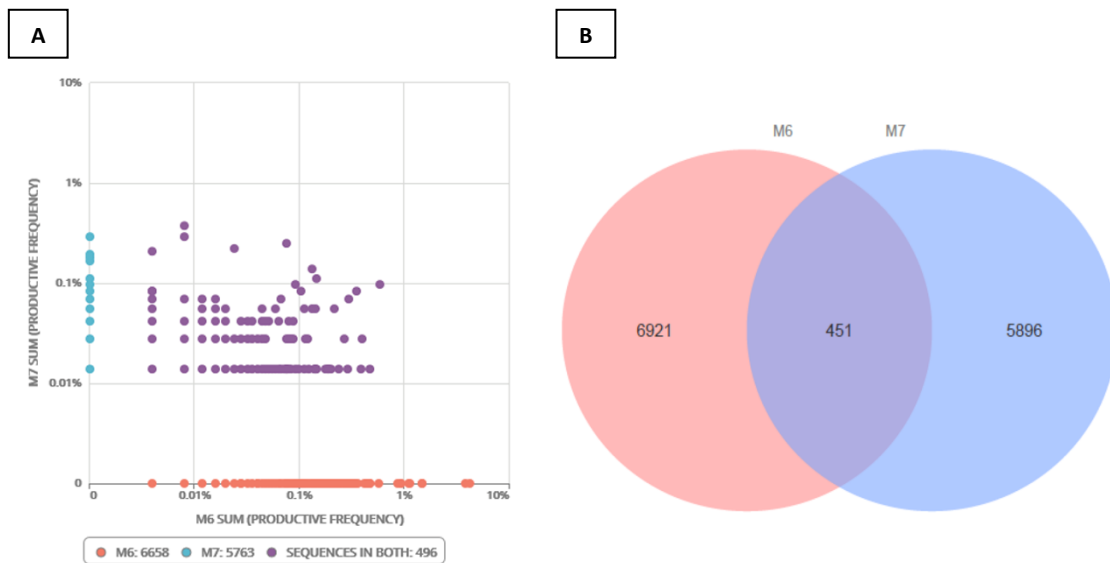


Figura 33. Representación de la diversidad clonal de TCRs en las muestras tumorales de la paciente. Las gráficas fueron obtenidas con el software ImmunoSEQ ANALYZER donde se muestra la abundancia de las frecuencias relativas para cada muestra (M6, progresión; M7, estabilización). **A)** Gráfica en la que se muestran las frecuencias relativas de los TCR para cada estado del tumor (M7, eje de las Y; M6, eje de las X) y las comunes en la zona central. **B)** Diagrama de Venn en el que se detalla el número total de reordenamientos para cada estadio de la enfermedad y el número de reordenamientos comunes a ambas muestras.

Muestra	Posición	Presente en:	Reordenamiento	Frecuencia relativa
Fase de progresión de la enfermedad (Muestra NEW)	1	1	CACGCCCTGCAGCCAGAAAGACTCAGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAAAGAGGGGCTGGGCTCCTACGAGCAGTACTTCGGGCC	4.318456%
	2	1	AAGCCTTGGAGCTGGAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCAGCTTGTAATAGCCCCGTACAATGAGCAGTCTTCGGGCCA	3.876156%
	3	1	CAGCCCTGCAGCCAGAAAGACTCAGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAAAGAGACTAGGAACCTACGAGCAGTACTTCGGGCC	1.519903%
	4	1	CTGCTGGGTTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCCAACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTAAGAACTGAAGCTTCTTTGGACAA	1.451548%
	5	1	CGCACAGAGCAGCGGGAAGCTCGGCCATGTATCGCTGTGCCAGCAGCTTAGGAAAAAGGCAGGGTAACACTGAAGCTTCTTTGGACA	1.145959%
	6	1	TCTGCCAGGCCCTCACATACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTAACCTCGGACTAGCGGGAACCGGGGAGCTGTTTTTGGAGAA	1.125854%
	7	1	CTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGCGGACAGGGGGCGTCTACGAGCAGTACTTCGGGCC	0.940893%
	8	1	CTCACTGGAGTCCGCTACAGCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGAGATGGGAGGCACTGAAGCTTCTTTGGACAA	0.940893%
	9	1	CTGAGCTCTGTGAGCTGGGGACTCAGCTTTGTATTTCTGTGCCAGCAGCCCCCGCAGCAAACTATGGCTACACCTTCGGTTCCG	0.8846%
	10	1	CTGCAGCCAGAAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCAGCCAAAGATTTGGCTAGCGGGAGCTTCGGGGAGCTGTTTTTGGAGA	0.583032%
Fase de estabilización de la enfermedad (Muestra OLD)	1	1	CTGACCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACATACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTGACAGGGGGCAGGGCTACACCTTCGGTTCCG	0.375313%
	2	1	TCTAAGAAAGCTCTTCTCAGTGACTCTGGCTTCTATCTCTGTGCCTGGAGTCCGGGACAGGGAGGAAGACCCAGTACTTCGGGCCA	0.29191%
	3	1	CCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCGACAGCTATGGCTACACCTTCGGTTCCG	0.29191%
	4	1	CTACACACCTGCAGCCAGAAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCAGCGCGGGACAGGGACTATGGCTACACCTTCGGTTCC	0.250209%
	5	1	ACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTTCGGGGGGCAGGAGTACTTCGGGCC	0.222408%
	6	1	GAGTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTCTGAGAGCTCCTATAATTACCCCTCCACTTTGGGAAC	0.208507%
	7	1	CTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTACCGTGAATCAGGAGAGACCCAGTACTTCGGGCCA	0.194607%
	8	1	CCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCACCCCGGCTATGGCTACACCTTCGGTTCCG	0.194607%
	9	1	GTGAAGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTATCTCTGTGCCAGCAGTGGGGACTAGCGAGGGCGCAGCAGTACTTCGGGCC	0.180706%
	10	1	ACTCTGACAGTGACAGTGCCCATCTCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGGCCCTAGCGGGGGGACCCAGTACTTCGGGCC	0.180706%

Tabla 12: Los diez reordenamientos más comunes para cada muestra.

Además, las frecuencias relativas de los diez reordenamientos más abundantes en todo el conjunto de secuencias identificadas también eran más altas durante la progresión (**Tabla 12**). Estos datos sugieren una infiltración de TILs más diversa a medida que la enfermedad avanzaba, con pocos clones de TILs dominando el microambiente tumoral durante la progresión. El 50% de los diez reordenamientos más abundantes presentes en el momento de la estabilización de la enfermedad permanecieron durante la fase de progresión. En total, un 8% de las secuencias presentes durante la estabilización también aparecieron en el tumor durante la progresión, indicando una infiltración persistente por parte de varios clones de linfocitos T.

4.2.3 – Perfil mutacional e identificación de mutaciones durante la evolución tumoral.

4.2.3.1 – Estimación de la firma genética (signature) de ambos tejidos tumorales.

Se utilizó la herramienta COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) para inferir la carga mutacional de cada tejido tumoral a partir de los datos del WES (*Whole Exome Sequencing*). Los datos se extrapolaron a partir de la abundancia de cada base (A, T, G o C) en el genoma de cada muestra (**Figura 34**).

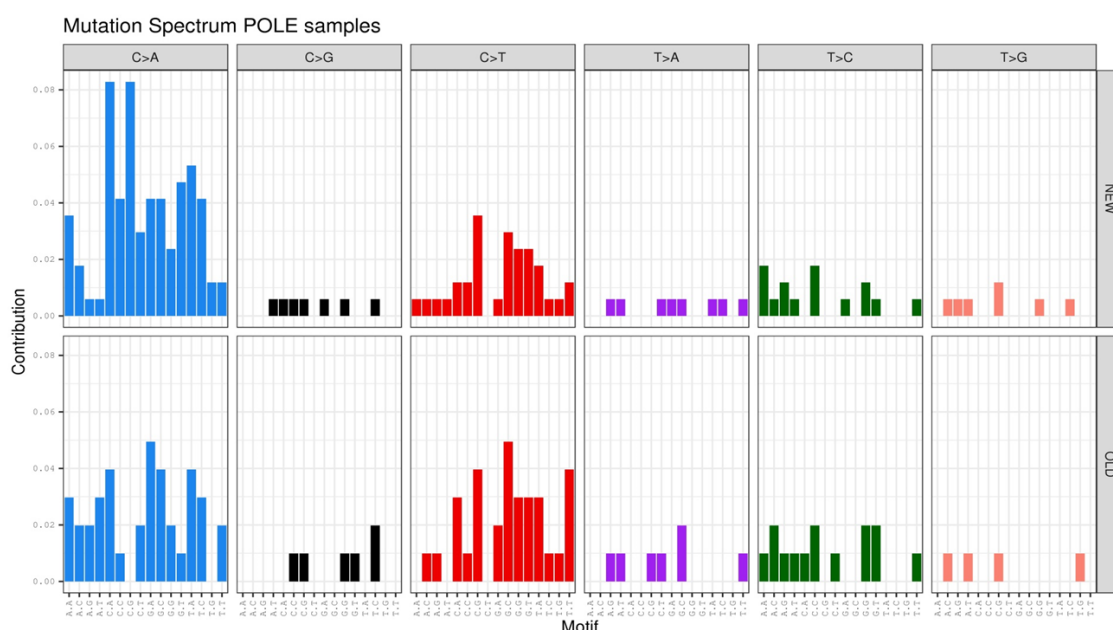
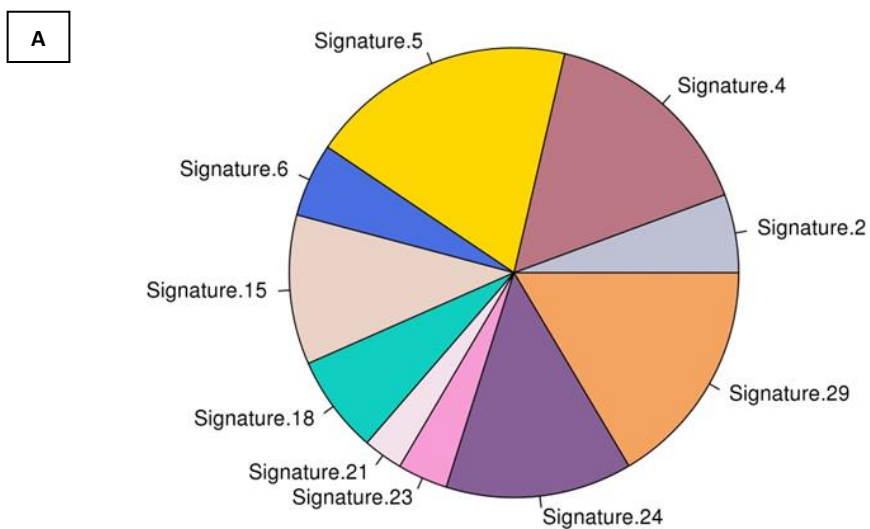


Figura 34: Abundancia de cada base nucleica respecto al resto de ellas. Con estos datos, COSMIC puede determinar las distintas firmas genéticas y su porcentaje relativo al total.

Los resultados indicaron las firmas genéticas (*signatures*) únicas y comunes para cada una de las muestras, así como sus frecuencias relativas respecto al total (**Tabla 13, Figura 35**).

OLD		NEW	
<i>Signature</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Signature</i>	<i>Porcentaje</i>
Signature 5	19.1928%	Signature 24	40.5295%
Signature 29	16.4542%	Signature 18	20.1733%
Signature 4	15.7368%	Signature 4	15.8887%
Signature 24	13.4168%	Signature 6	13.7232%
Signature 15	10.7573%	Signature 12	6.8523%
Signature 18	7.0359%	Signature 20	1.9288%
Signature 2	5.6384%	Signature 11	0.9041%
Signature 6	5.289%		
Signature 23	3.6131%		
Signature 21	2.8656%		

Tabla 13: Porcentaje relativo de cada *signature* identificada en cada una de las muestras. Se representan por orden de abundancia. Existen *signatures* únicas para cada muestra y también comunes a ambas muestras.



B

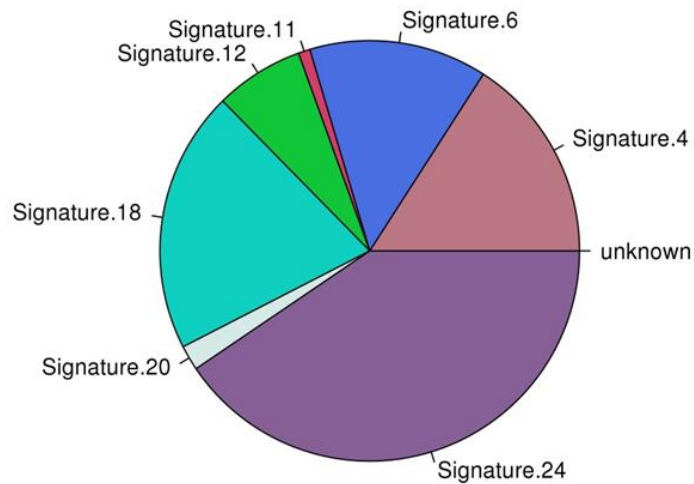


Figura 35: Representación gráfica de las diferentes firmas genéticas (*signatures*) en cada una de las muestras tumorales. **A)** Muestra OLD, estabilización de la enfermedad; **B)** Muestra NEW, progresión de la enfermedad.

La lista detallada y completa de cada una de las diferentes firmas genéticas puede consultarse *online* (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures_v2). En este caso, el estudio se centró en analizar cada una de las que estaban presentes en los tejidos tumorales de la paciente. En líneas generales, existía mayor variabilidad de *signatures* durante la estabilización de la enfermedad, mientras que el momento de la progresión se identifica menor número de *signatures* diferentes, aunque sus abundancias relativas son mayores que en el momento de la estabilización (especialmente patente en la *signature* 24).

De especial interés resultaron dos de las *signatures* identificadas:

- **Signature 18.** Asociada clásicamente a neuroblastoma. Su presencia se hace más patente durante la progresión de la enfermedad (su abundancia aumenta desde un 7% a un 20%).
- **Signature 2.** Asociada a una gran variedad de tipos de cáncer, resultó de especial interés por estar relacionada con la activación de las deaminasas AID/APOBEC por infecciones virales y/o inflamación. Esta *signature* está presente durante la estabilización, pero se pierde durante la progresión.

4.2.3.2 – Perfil mutacional durante la evolución de la enfermedad.

Se realizó secuenciación masiva del exoma completo de muestras tumorales obtenidas durante la estabilización de la enfermedad por el tratamiento con *Celyvir* (muestra OLD) y en el momento de progresión final (muestra NEW), y de la línea germinal a partir de las células mesenquimales. La comparación del WES de las muestras tumorales con el de la línea germinal permitió identificar variabilidad en la secuencia tumoral, lo que denominamos perfil mutacional. La comparación del WES entre las dos muestras tumorales permitió identificar los cambios en el perfil mutacional que sucedieron durante la evolución del tumor. El número total de mutaciones genéticas en el momento de la progresión era más alto que aquellas detectadas durante la estabilización de la enfermedad (169 vs 101 mutaciones). Un total de 55 mutaciones resultaron comunes para ambas muestras (**Figura 36**).

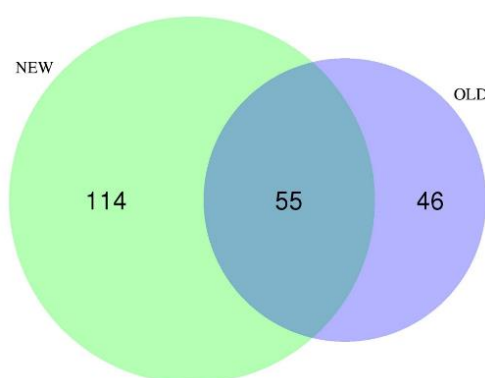


Figura 36: Diagrama de Venn que muestra el número de mutaciones genéticas detectadas en cada muestra y las comunes para ambas.

4.2.3.3 – Identificación de mutaciones tumorales durante la evolución usando la herramienta CONDEL.

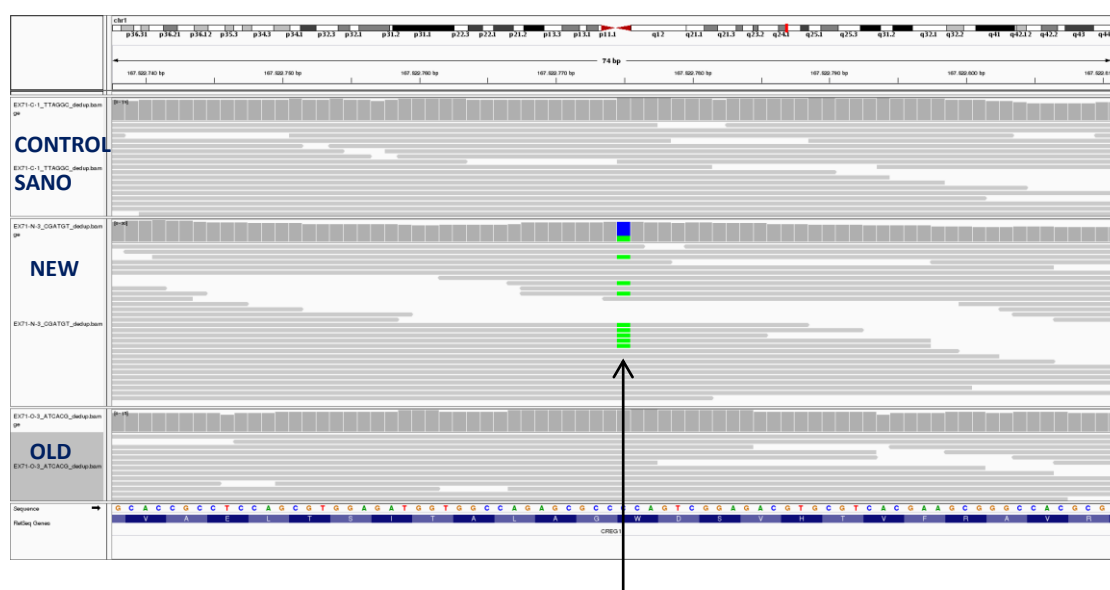
Se usó la herramienta CONDEL para identificar mutaciones génicas asociadas a la evolución tumoral, con el objetivo de identificar las alteraciones que pudiesen explicar los cambios que sucedieron en el tumor y pudieron causar la resistencia final a la terapia *Celyvir*. El software generó una tabla en el que se detallan las mutaciones tumorales, así como todos los parámetros de interés. La tabla completa puede consultarse en el Anexo 7.

Los 27 genes que el software CONDEL identificó se muestran en la **Tabla 14**:

Gen	Descripción
IFT140	Intraflagellar transport 140
DNASE1	Deoxyribonuclease 1
DNAH9	Dynein axonemal heavy chain 9
GALNT15	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15
ZNF98	Zinc finger protein 98
GABBR1	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
KIAA0391	KIAA0391
MIPOL1	Mirror-image polydactyly 1
RYR1	Ryanodine receptor 1
UCHL1	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1
EML2	Echinoderm microtubule associated protein like 2
CELSR3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
ABHD2	Abhydrolase domain containing 2
RIPK2	Receptor interacting serine/threonine kinase 2
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
VWA3B	Von Willebrand factor A domain containing 3B
AGL	Amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
PABPC1	Poly(A) binding protein cytoplasmic 1
SLK	STE20 like kinase
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
GLE1	GLE1, RNA export mediator
LRP1B	LDL receptor related protein 1B
TRPV6	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6
ASIC5	Acid sensing ion channel subunit family member 5
SI	Sucrase-isomaltase
CREG1	Cellular repressor of E1A stimulated genes 1
PSMD1	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 1

Tabla 14: Listado detallado de las mutaciones tumorales inferidas mediante CONDEL y su descripción.

De entre todos los genes mutados, el gen *CREG1* (*Cellular repressor of E1A stimulated genes 1*) resulta particularmente atractivo como candidato a validación debido que reprime la actividad de la proteína E1A del adenovirus, y también controla la activación y represión de las rutas que inducen proliferación e inhiben diferenciación. La mutación aparece sólo en el caso del estado de progresión (muestra NEW), siendo ésta somática y heterocigota. En el visualizador de secuencias IGV (*Integrative Genomics Viewer*) se puede apreciar que esta mutación sólo aparece en la muestra NEW (**Figura 37**).



Posición en el genoma

1: 167,522,775

Figura 37: Posición del gen *CREG1* en el genoma humano según el visualizador de secuencias IGV.

Los programas de predicción asociados a CONDEL identifican la mutación como un cambio de nucleótido en la última posición del triplete, con lo que se pasaría de sintetizar un triptófano (W) a una cisteína (C) en la posición 68 de la proteína (**Figura 38**).

Por tanto, en la cadena mutada, la conformación del triplete y su traducción sería como se muestra en la **Figura 39**.

Los programas de predicción establecen que esta mutación está situada en el dominio funcional de la proteína. Estos programas también señalan a esta mutación como deletérea casi con total probabilidad, puesto que el residuo está muy conservado. Esta mutación no está descrita con anterioridad en bases de datos como COSMIC o cBioPortal (repositorios de mutaciones en cáncer), aunque sí están descritas otras mutaciones en el mismo gen. A nivel de estructura tridimensional, esta mutación parece desestabilizar la proteína.

Secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína salvaje (663 nt):

ATGGCCGGGCTATCCCGCGGGTCCGCGCGCGCACTGCTCGCCGCCCTGCTGGCGTCGACGCTGTTGGCGC
TGCTCGTGTGCCCCGCGCGGGGTGCGGGCGGCCGGGACCACGGGACTGGGACGAGGCCCTCCCGGCTGCC
GCCGCTACCACCCCGCGAGGACGCGGCGCGCGTGGCCCGCTTCGTGACGCACGTCTCCGAC**TGG**GGCGCT
CTGGCCACCATCTCCACGCTGGAGGCGGTGCGCGGCCGGCCCTTCGCCGACGTCTCTCGCTCAGCGACG
GGCCCCCGGGCGCGGGCAGCGGCGTGGCCCTATTTCTACCTGAGCCCGCTGCAGCTCTCCGTGAGCAACCT
GCAGGAGAATCCATATGCTACACTGACCATGACTTTGGCACAGACCAACTTCTGCAAGAAACATGGATTT
GATCCACAAAGTCCCCTTTGTGTTACATAATGCTGTCTAGGAACTGTGACCAAGGTGAATGAAACAGAAA
TGGATATTGCAAAGCATTCGTTATTTCATTCGACACCCTGAGATGAAAACCTGGCCTTCCAGCCATAATTG
GTTCTTTGCTAAGTTGAATATAACCAATATCTGGGTCCTGGACTACTTTGGTGGACCAAAAATCGTGACA
CCAGAAGAATATTATAATGTCACAGTTCAGTGA

Traducción a proteína salvaje (220 aa):

MAGLSRGSARALLAALLASTLLALLVSPARGRGRDHGDWDEASRLPPLPPREDAARVARFVTHVSD**W**GA
LATISTLEAVRGRPFADVLSLSDGPPGAGSGVPYFYLSPLQLSVSNLQENPYATLTMTLAQTNFCKKHGF
DPQSPLCVHIMLSGTVTKVNETEMDIKHSLEFIRHPEMKTWPSSHNWFFAKLNITNIWVLDYFGGPKIVT
PEEYYNVTVQ

Figura 38: Posición del triplete de interés y el aminoácido que la proteína da en condiciones normales.

Secuencia wild type (salvaje)	. . .CGACT TGG GGCG . . .	Triptófano (W)
Secuencia mutada	. . .CGACT TGT GGCG . . .	Cisteína (C)

Figura 39: Representación del cambio predicho por CONDEL para CREG1 en la muestra NEW.

4.2.3.4 – Identificación de neoepítopos tumorales usando la herramienta NetMHC.

Una vez identificados los perfiles mutacionales de cada una de las muestras tumorales, se comprobó para cada mutación si se expresaba en el transcriptoma. Para ello se interrogaron los resultados del RNA-Seq para cada una de las mutaciones. A continuación, se usó la herramienta NetMHC para predecir si las mutaciones genéticas podrían actuar como neoepítopos, basándonos en la presencia de los SNVs detectados en cada muestra tumoral y cotejándolos con los HLA conocidos de la paciente. Este análisis reveló una carga de neoepítopos candidatos mayor durante la progresión del tumor comparado al momento de la estabilización (18 vs 5). Los 5 candidatos encontrados durante la fase de estabilización fueron detectados también durante la progresión. (**Tabla 15**).

TABLA 15a – Neoepítomos predichos durante la fase de estabilización (muestra OLD)

Identidad (proteína a partir de la cual procede el péptido)	Número de veces que la identidad aparece en el análisis	Descripción
ASIC5	2	Acid Sensing Ion Channel Subunit Family Member 5
YLP M1	1	YLP Motif Containing
SLC38A1	1	Solute Carrier Family 38 Member 1
HMGB3	1	High Mobility Group Box 3

TABLA 15b – Neoepítomos predichos durante la fase de progresión (muestra NEW)

Identidad (proteína a partir de la cual procede el péptido)	Número de veces que la identidad aparece en el análisis	Descripción
OR2M2	5	Olfactory Receptor Family 2 Subfamily M Member 2
UCHL1	1	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
ASIC5	3	Acid Sensing Ion Channel Subunit Family Member 5
YLP M1	1	YLP Motif Containing
ZNF98	1	Zinc Finger Protein 98
AGL	1	Amylo-Alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase
GHRL	2	Ghrelin and Obestatin Prepropeptide
GALNT15	2	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 15
CELSR3	1	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3
UCHL1	2	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
SLC38A1	1	Solute Carrier Family 38 Member 1
HMGB3	1	High Mobility Group Box 3

Comprobamos también la integridad de los genes relacionados con el procesamiento antigénico y presentación antigénica, y no se encontró déficit en ninguno de ellos. De hecho, la expresión de la mayoría de estos genes se encontraba más elevada durante la progresión que durante la estabilización. (**Figura 40**)

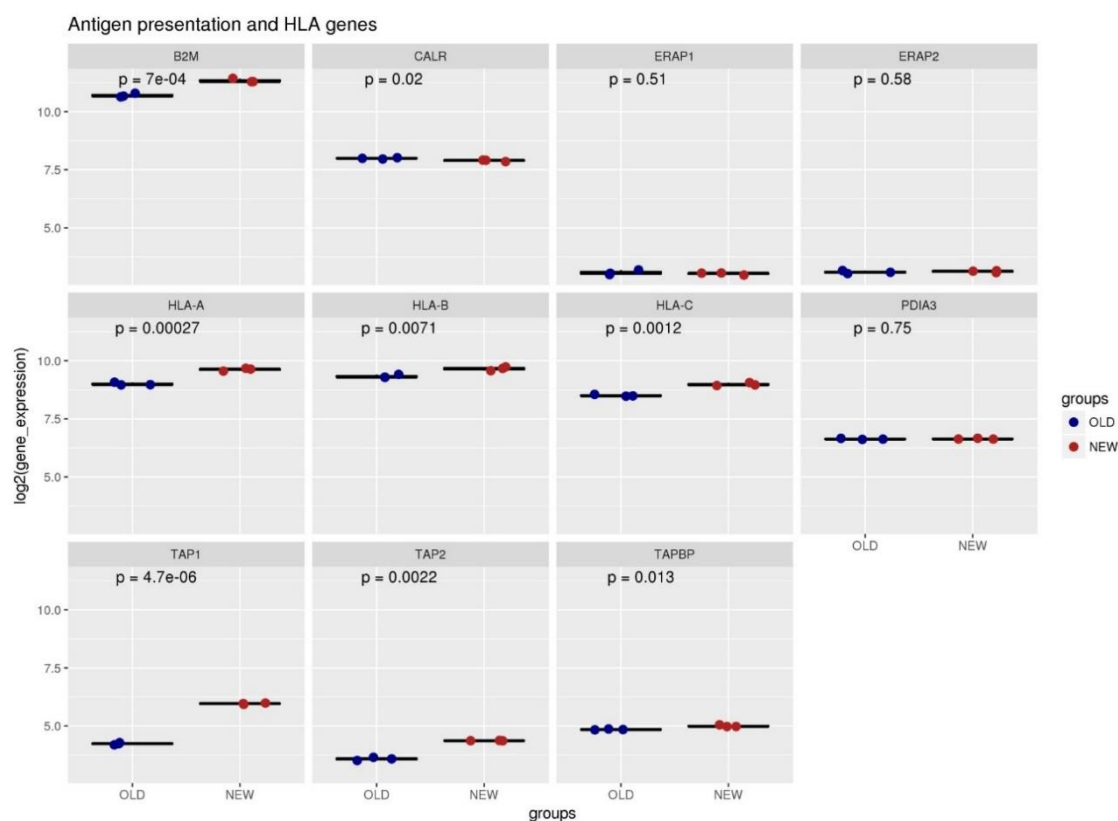


Figura 40: Representación de genes y tipos de HLA de la paciente en ambos momentos del tratamiento.

4.2.4 – Análisis del estado del microambiente tumoral de la paciente en ambos momentos del tratamiento por PCR cuantitativa.

A pesar de no contar con muestra tumoral viable para realizar ensayos funcionales que nos permitieran validar todos los resultados bioinformáticos anteriores, sí que contábamos con tejido congelado en ambos momentos para poder realizar una PCR cuantitativa con la que comprobar el estado del microambiente tumoral para genes relacionados con agotamiento de la respuesta inmune. Estos genes fueron los receptores TIM3, LAG3 y PD1, y los dos ligandos más comunes para cada uno de ellos (HMGB1 y CEACAM; HLA-DR y LSELECTIN; y PDL1 y PDL2, respectivamente), así como las tres isoformas conocidas de TGF- β (TGFB1, TGFB2 y TGFB3). Los resultados indicaron que el microambiente durante la progresión tumoral muestra niveles de expresión significativamente más elevados para el receptor PD1, así como para sus respectivos ligandos (PDL1 y PDL2), si se comparaba con el estado de estabilización de la enfermedad; el receptor LAG3 también se encuentra sobreexpresado de manera significativa en la progresión,

pero los niveles de expresión de sus dos ligandos (HLA-DR y LSELECTIN) son significativamente menores (**Figura 41**).

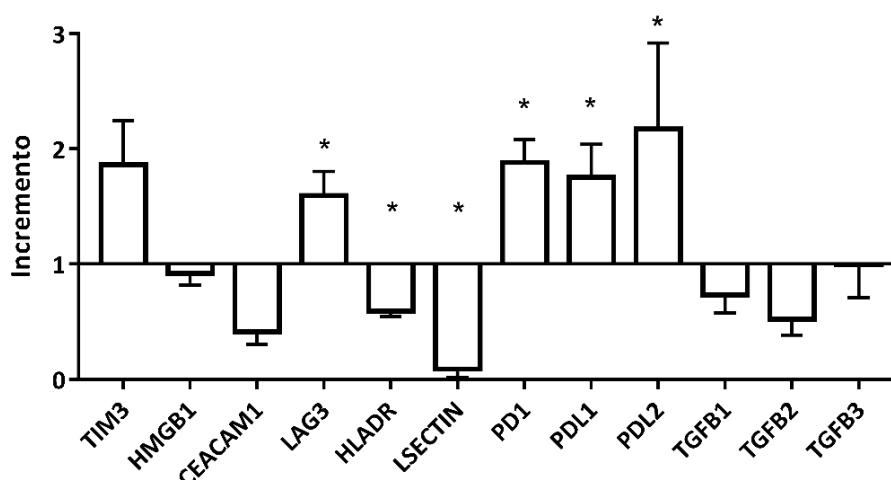


Figura 41: Análisis por qPCR de las masas tumorales de la paciente en ambos momentos del tratamiento. Las barras representan el momento de progresión clínica (NEW). El resultado se normalizó a los valores de la muestra correspondiente a la estabilización clínica (OLD) ($p < 0.05$).

4.3 - Modelo murino de *Celyvir*

Desarrollamos dos líneas paralelas de estudio con modelos murinos: por un lado, un modelo inducido, en el que utilizamos los ratones WT TH-MYCN para la inoculación de una línea celular murina de neuroblastoma (derivada de los tumores de estos mismos ratones); y por otro, el propio modelo murino transgénico de NB en el que los animales desarrollan tumor espontáneamente.

4.3.1 – Caracterización de *Celyvir* murino

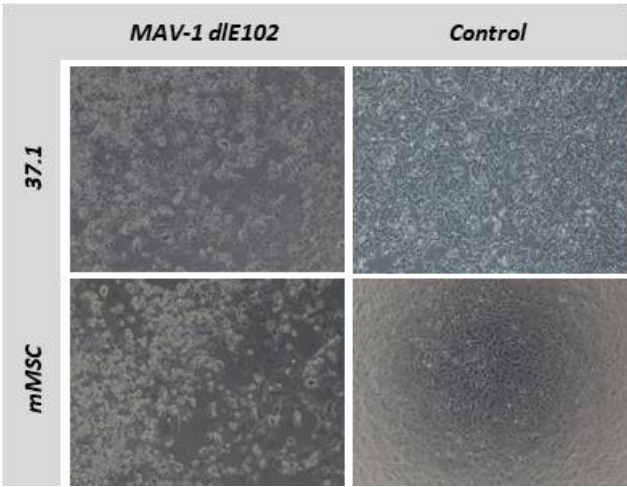
4.3.1.1 – Comparación de la capacidad de infección de MAV-1 en las células mesenquimales murinas y en la línea control 37.1.

Para replicar *Celyvir* en un modelo de cáncer infantil, se infectaron células mesenquimales murinas con el adenovirus oncolítico murino MAV-1 dIE102 (ver Métodos). Se comprobó que la susceptibilidad de la línea 37.1 a la infección con MAV-1 dIE102 era mayor que la que presentaban las mMSCs a las mismas dosis (**Figura 42A**). La susceptibilidad a la infección por MAV-1 dIE102 se calculó tomando la media del porcentaje por triplicado de células negativas para el 7AAD (células vivas) y relativizándolo posteriormente al 100%, suponiendo que la

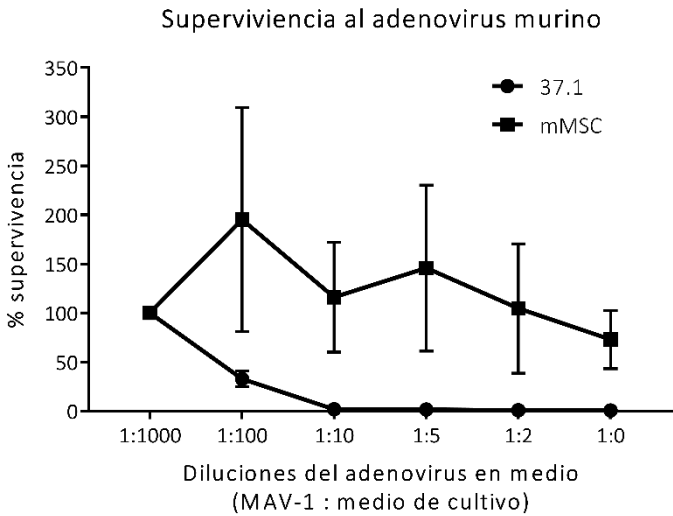
máxima viabilidad se tiene en la dilución mayor (1:1000). Así, se obtuvo la siguiente gráfica, en la que se representa la viabilidad celular de ambas poblaciones (37.1 y mMSCs) a los 7 días tras la infección (**Figura 42B**). Como se puede observar, la mortalidad de la línea 37.1 es mayor que la que presentan las mMSCs a las mismas dosis, siendo ésta total a partir de la concentración 1:10 (MAV-1:medio de cultivo). Esto indica que la susceptibilidad de las mMSC al adenovirus es menor que la que presentan las células tumorales.

Por último, se hizo un *plaque assay* como ensayo complementario a los anteriores (**Figura 42C**). La mortalidad fue de aproximadamente el 60% en la menor dilución del sobrenadante viral (1:10) y prácticamente nula en la mayor dilución (1:1000).

A



B



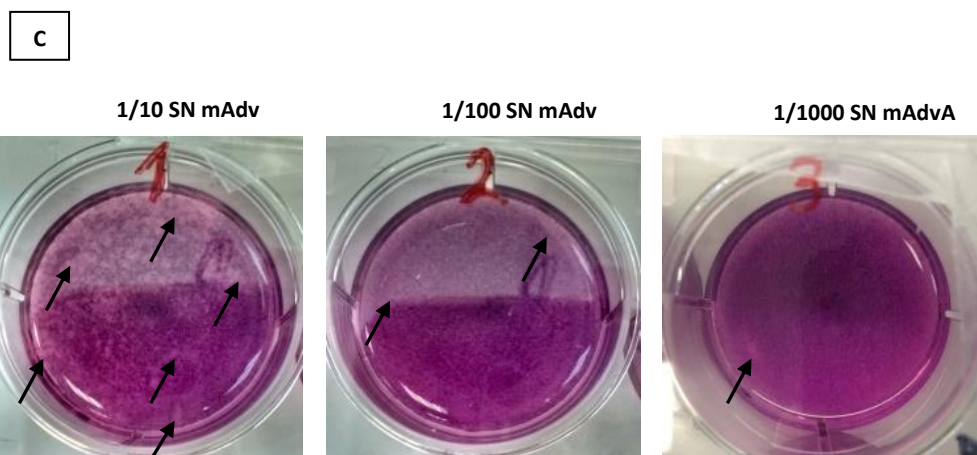
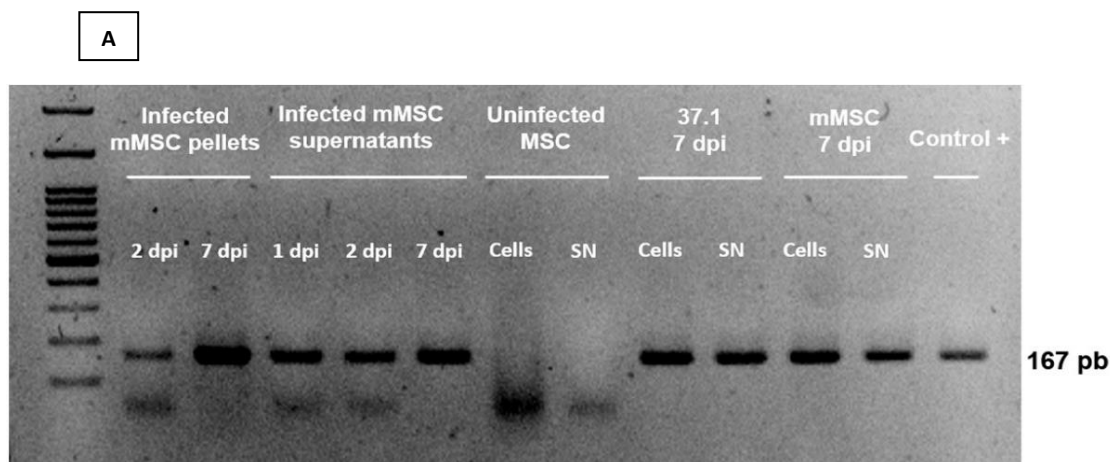


Figura 42: Efectos del adenovirus oncolítico murino MAV-1 dIE102 sobre las células productoras 37.1 y las mMSC. **A)** Vista al microscopio óptico de la mortalidad celular producida por el adenovirus en ambos tipos de células (7 dpi). **B)** Cuantificación por citometría de flujo de la mortalidad celular a diferentes concentraciones del virus en ambos tipos de células 7 días post-infección. Se muestran las barras de desviación estándar para cada triplicado. **C)** *Plaque assay* en el que se aprecian las calvas de lisis *de visu* por el efecto citopático del virus. Se señalan con flechas las zonas en las que la agarosa no aparece tapizada por células.

Se comprobó si el adenovirus MAV-1 tenía capacidad replicativa en las mMSCs. Se observó que tras 48 horas las células 37.1 habían permitido la replicación y liberación al sobrenadante de partículas virales; las mMSCs también habían permitido la replicación del mAdv y habían liberado partículas virales al medio, pero en menor cantidad que las células control. Siete días tras la infección, se detectaba mayor cantidad de ADN en el sobrenadante de las mMSCs que en el de las 37.1. La replicación es por tanto selectiva en tanto que es máxima en la línea tumoral productora, pero el virus también es funcional en las mMSCs (**Figura 43A-C**).



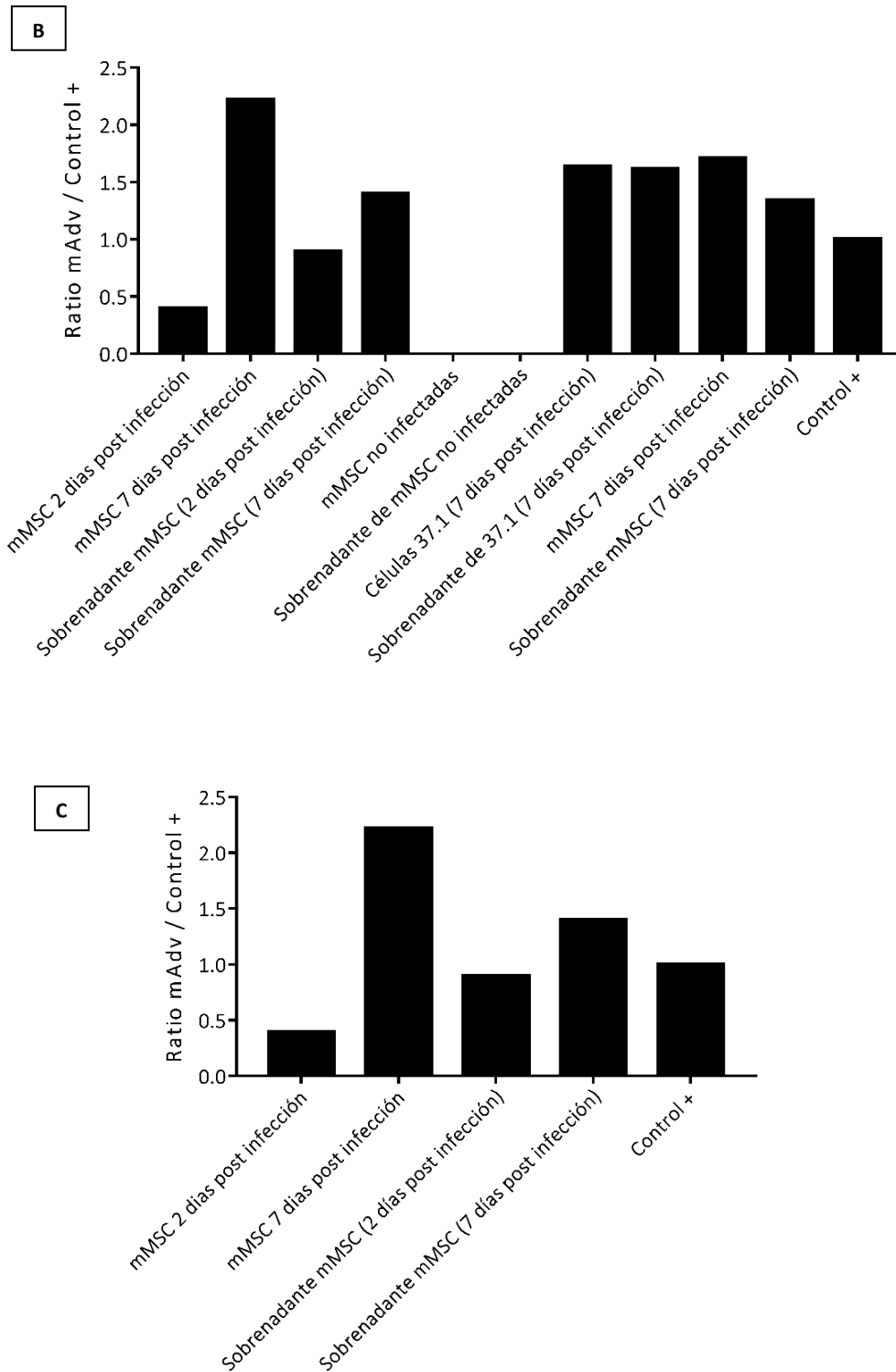


Figura 43: El adenovirus MAV-1 replica en las células mesenquimales murinas. **A)** PCR convencional a partir de DNA genómico que muestra la cuantificación adenoviral en células infectadas y sus respectivos sobrenadantes (tanto mMSCs como células productoras 37.1). **B)** Representación gráfica de la PCR mostrada en la figura A. Los datos se obtuvieron cuantificando las bandas de la PCR con el software ImageJ. El control positivo se utilizó para calcular la ratio para cada muestra. **C)** Representación gráfica que muestra únicamente la capacidad de replicación viral en las mMSCs a distintos tiempos.

4.3.2 – Modelo murino inducido.

4.3.2.1 – Efectos de la administración repetida de Celyvir in vivo.

Celyvir se administra en humanos semanalmente, y por lo tanto su distribución en el organismo, la replicación viral y la inmunidad antiadenoviral son aspectos importantes que conocer de esta terapia. Para responder estas cuestiones, se utilizó el modelo de neuroblastoma inducido (línea celular 36769 implantadas sobre la glándula adrenal de ratones 129/SvJ). Estos animales fueron tratados por vía intravenosa con 3 dosis de *mCelyvir* (n = 5) o con el adenovirus MAV-1 desnudo como comparador (n = 6). Se recolectó la sangre periférica de estos animales justo antes y durante dos días después de recibir el tratamiento correspondiente. Un esquema del procedimiento experimental se muestra en la **Figura 43**.

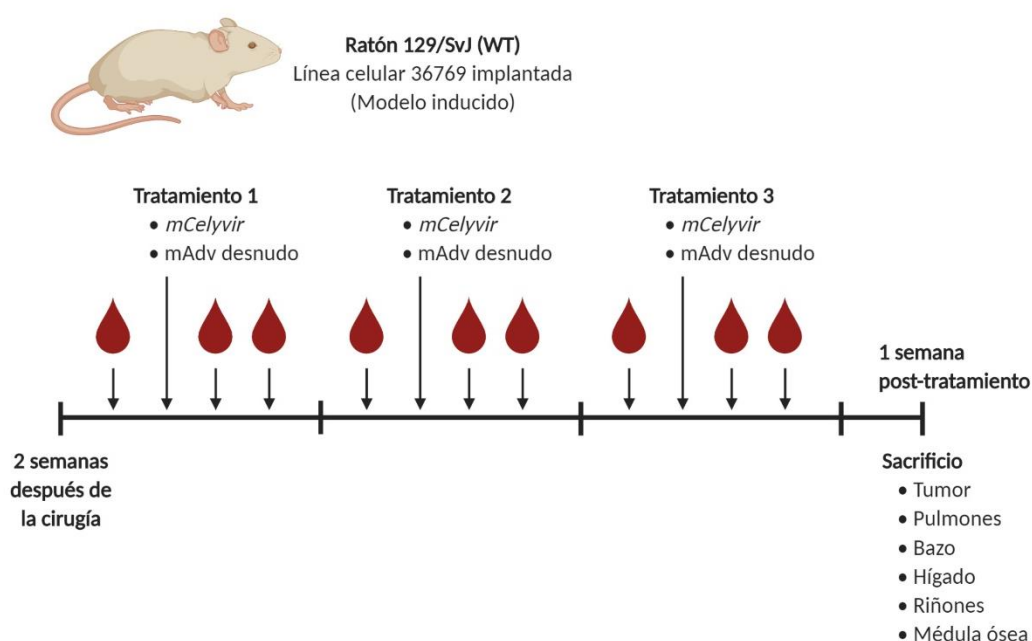


Figura 43: Esquema del procedimiento experimental seguido para comprobar la presencia del adenovirus en el organismo de los ratones implantados. (Imagen creada con Biorender.com.)

La cinética de los anticuerpos neutralizantes anti-adenovirales detectados en el suero mostró que todos los animales tratados poseían un título positivo de anticuerpos mientras que ninguno de los ratones no tratados los presentaba (**Figura 44**). Los niveles empezaban a ser detectables a partir de la tercera dosis del tratamiento (ya fuera virus desnudo o *mCelyvir*). Los títulos tendían a ser más altos para los animales que recibían mAdv desnudo. Por lo tanto, pudimos concluir que existía una respuesta inmune humoral contra el adenovirus oncolítico MAV-1 tras la administración repetida del tratamiento.

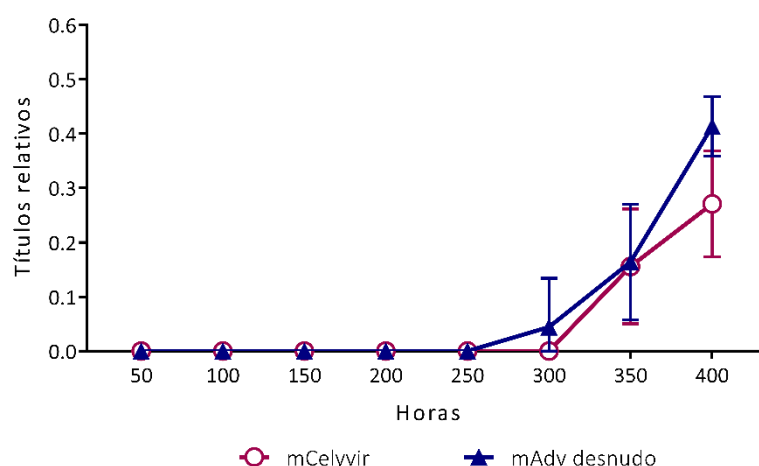


Figura 44: Cinética de la detección de anticuerpos antiadenovirus murino en la sangre de los ratones a lo largo de las horas.

Analizamos también la presencia de adenovirus murino en las muestras de sangre periférica de estos ratones. Las muestras correspondientes a la primera semana del tratamiento resultaron todas negativas, siendo detectada la presencia de ADN genómico viral a partir de la segunda semana de tratamiento. Observamos que las partículas adenovirales disminuían en ambos grupos de tratamiento a partir de la tercera semana, siendo detectables únicamente en el grupo que recibía *mCelyvir* (Figura 45). Por lo tanto, pudimos concluir que las partículas virales circulantes disminuían en la sangre periférica de estos ratones a medida que aumentaban los niveles de anticuerpos anti-MAV-1 neutralizantes.

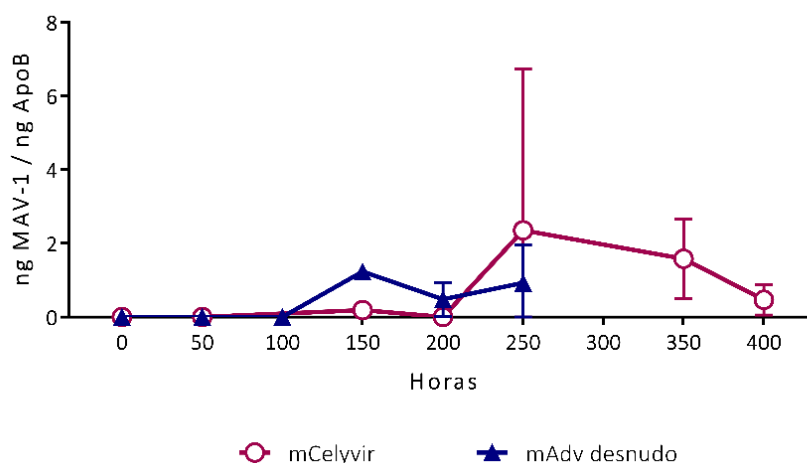


Figura 45: Cinética de la detección del adenovirus murino en la sangre de los ratones a lo largo de las horas.

Por último, comprobamos la biodistribución del adenovirus después de varias infusiones repetidas (**Figura 46**). Los mismos ratones descritos en el apartado anterior fueron exanguinados y sacrificados una semana después de recibir su cuarto tratamiento intravenoso de *mCelyvir* o de mAdv desnudo. Varios órganos y masas tumorales se recogieron para su posterior análisis por qPCR. En nuestra experiencia, la administración del mAdv MAV-1 en mMSCs resultó en una mayor acumulación de virus en las masas tumorales ($p = 0.08$) y los pulmones ($p = 0.09$), si se comparaba con los niveles de ADN viral obtenidos en esos mismos órganos tras administrar mAdv desnudo. No se encontraron diferencias en los bazo, hígados y riñones de los animales analizados. Los bazo y los pulmones fueron los órganos en los que mayor cantidad de virus se detectó a nivel global.

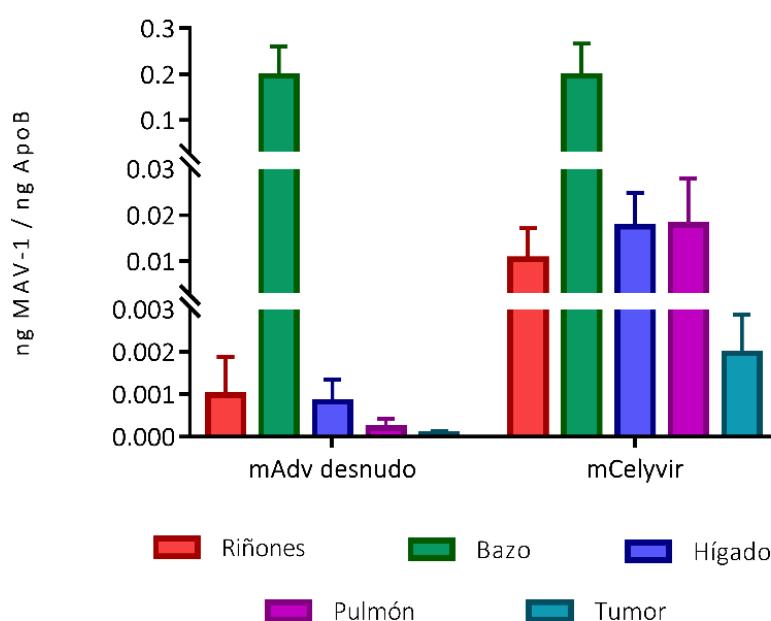


Figura 46: Abundancia relativa de adenovirus murino en los distintos órganos de los ratones tratados con mAdv desnudo o con *mCelyvir*.

4.3.2.2 – Efectos locales en los tumores de ratones implantados y tratados con Celyvir sistémico.

Se implantaron 3×10^5 células tumorales directamente en la glándula adrenal de ratones 129/SvJ salvajes mediante abordaje por laparotomía. A estos animales se les administraron dos dosis de tratamiento semanales con *mCelyvir* antes de su sacrificio. En la **Figura 47** se muestra un esquema del proceso completo que se siguió con estos animales. Los tumores se analizaron para detectar el componente inmune de la muestra, así como los cambios a nivel del microambiente que se producían a causa del tratamiento.

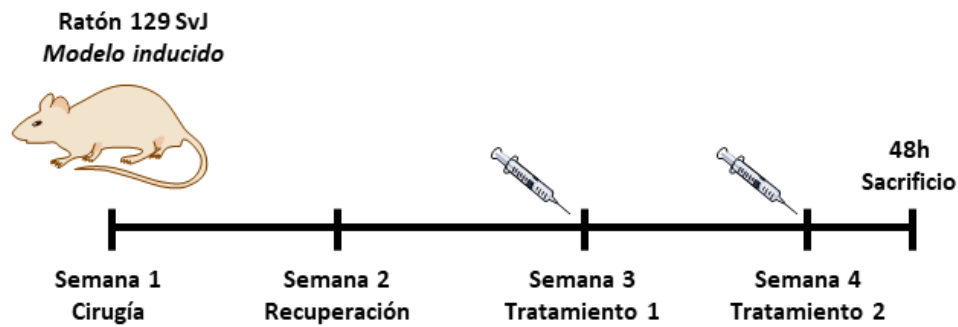
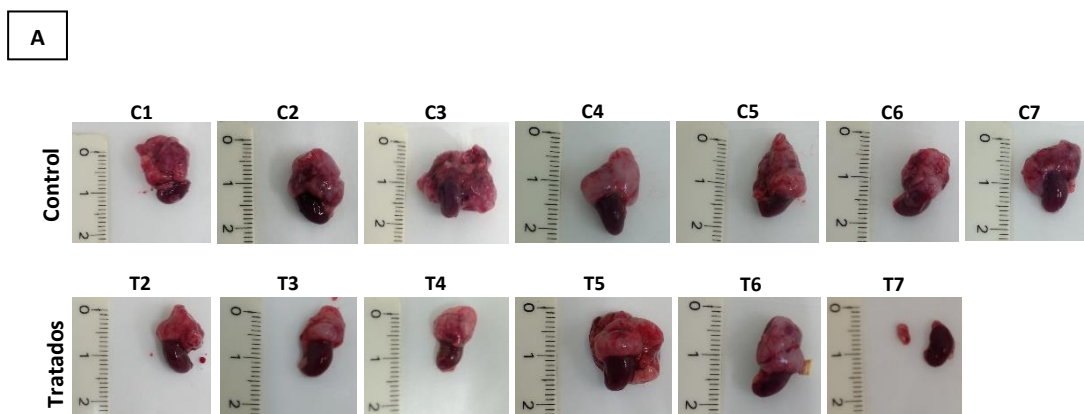


Figura 47: Esquema general del procedimiento de implantación de la línea tumoral 36769 en la glándula adrenal izquierda de ratones 129/SvJ. Tras la cirugía los ratones reposaron de la misma, y dos semanas tras la implantación se comenzó el tratamiento con *mCelyvir*. Se les administraron dos líneas de tratamiento semanales intravenoso a MOI 200 (partículas físicas). A la cuarta semana los animales se anestesiaron, se exanguinaron y se sacrificaron, y se extrajo la masa tumoral y la sangre periférica para su posterior análisis.

El día del sacrificio, los tumores se midieron a lo largo y a lo ancho con ayuda de una regla. Una vez tomadas las medidas, se aplicó la fórmula siguiente para averiguar el volumen aproximado de los tumores de estos animales:

$$\left(\frac{3.14}{3}\right) \times \left(\frac{\text{ancho}}{2}\right)^2 \times \left(\frac{\text{largo}}{2}\right)$$

Una vez averiguados los volúmenes se realizó una comparativa del tamaño de los tumores de los distintos grupos (**Figura 48**). Los tumores de los animales tratados con *mCelyvir* eran significativamente más pequeños ($p = 0.045$) que los tumores de los animales no tratados (controles).



B

	ID	Ancho (mm)	Largo (mm)	VOLUMEN (mm ³)
Controles	C1	12	13	979,68
	C2	11	15	949,85
	C3	18	16	2712,96
	C4	8	11	368,43
	C5	8	15	502,40
	C6	9	11	466,29
	C7	11	13	823,20
Tratados	T2	11	9	381,51
	T3	9	7	296,73
	T4	9	9	179,50
	T5	13	13	1149,76
	T6	8	10	334,93
	T7	2	4	8,37

C

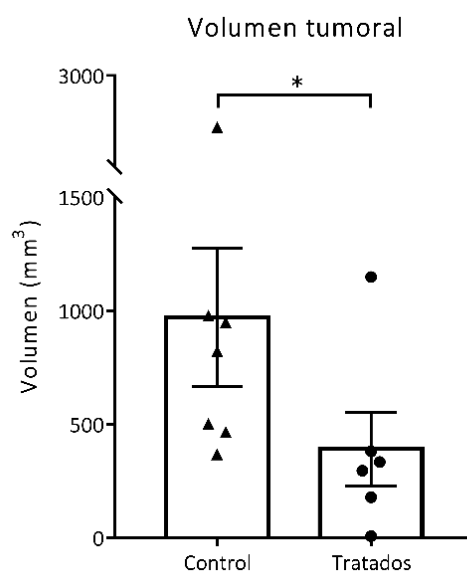


Figura 48: Comparativa de tamaños y volúmenes entre ambos grupos de tumores inducidos (controles y tratados) **A)** Fotografías de los tumores en el momento de la extracción. Se muestra la masa tumoral adherida a la glándula suprarrenal y por lo tanto al riñón (izquierdo). A partir de las medidas se puede extrapolar el volumen aproximado de cada uno de los tumores. (C=Controles; T=Tratados) **B)** Volumen obtenido para cada uno de los tumores siguiendo la fórmula utilizada. **C)** Gráfica mostrando la media y el error estándar de la media (EEM) para ambos grupos de animales. El volumen tumoral de los animales tratados con *mCelyvir* es significativamente menor que el de los controles ($p = 0.045$).

4.3.2.3 – Estudio de los leucocitos infiltrantes de tumor en el modelo inducido.

A continuación, los tumores fueron procesados para su análisis. Una alícuota fue disgregada para análisis de las poblaciones leucocitarias infiltrantes del tumor, por citometría de flujo. Los primeros resultados obtenidos (**Figura 49**) nos indicaron que el tratamiento con *mCelyvir* se asoció a un mayor número de células CD45+ infiltrantes en los tumores ($p = 0.045$). Se muestra el número de células de cada subtipo por unidad de volumen (mL).

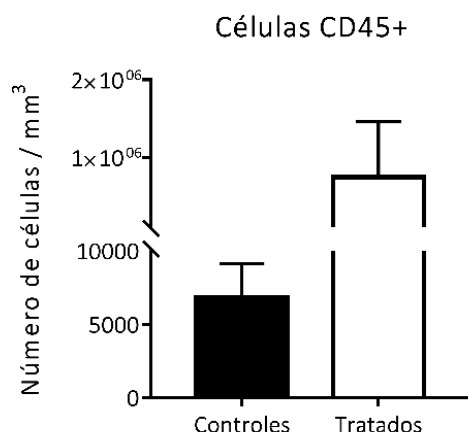


Figura 49: Número de células CD45+ por unidad de volumen en los tumores de los animales tratados y de los animales control implantados con la línea de neuroblastoma murino 36769. La diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control ($n = 7$) y tratado con *mCelyvir* ($n = 6$).

Las células CD45+, denominadas globalmente como leucocitos, se dividen a su vez en el componente mieloide (macrófagos y células mieloides supresoras, CD11B+; y células dendríticas, CD11C+) y en el componente linfoide (linfocitos T, CD3+; linfocitos B, B220+; y células *natural killer*, NK1.1+). De cada tipo de célula inmune se muestran a su vez distintos subtipos (**Figura 50**). Los linfocitos están representados por tres grandes grupos celulares: linfocitos T (CD3+), linfocitos B (B220+) y células *natural killer* o NK (NK1.1+). La abundancia de los linfocitos T y B tiende a ser mayor en los animales tratados con *mCelyvir*, mientras que ocurre lo contrario con las células NK; ninguna de las distintas poblaciones presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales.

La citometría de flujo permitió conocer no solo la abundancia de cada una de estas subpoblaciones sino también sus fenotipos y/o estados de activación (**Figura 51**). En subpoblaciones, los linfocitos CD4+ presentaban una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), siendo más abundantes en el grupo tratado. En la subpoblación CD8+ los cambios no resultaron estadísticamente significativos, pero se detectó una abundancia relativa mayor en el grupo de los animales tratados. Los linfocitos T reguladores (Treg) CD4+, también tendían a ser más abundantes en los animales tratados, pero tampoco de manera significativa.

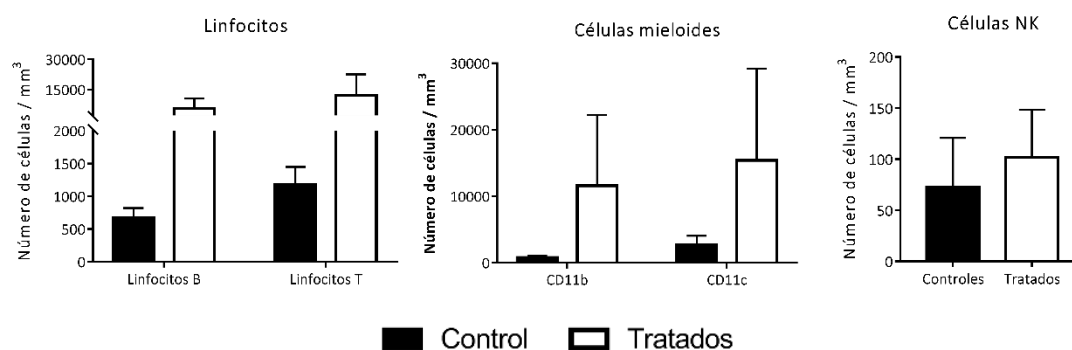


Figura 50: Linfocitos, células mieloides y células NK en los tumores de ambos grupos de ratones implantados con la línea de neuroblastoma murino 36769. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Las diferencias sólo resultan significativas en el caso de los linfocitos. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 7) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

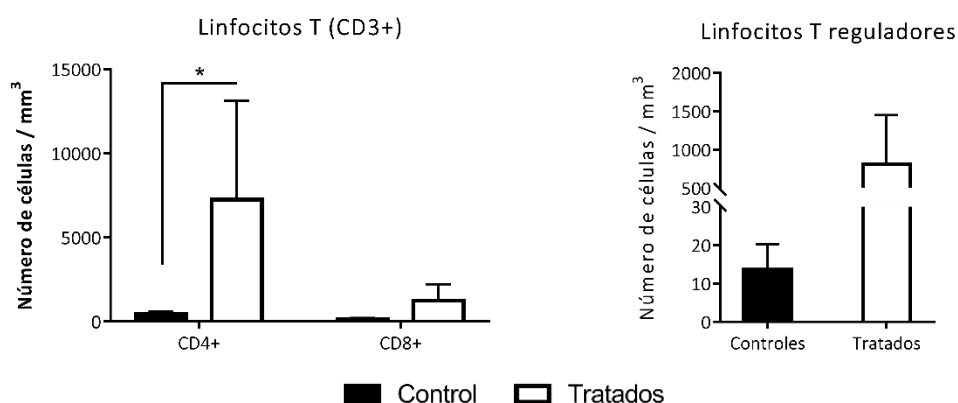


Figura 51: Linfocitos CD3+ y de los linfocitos T reguladores en los tumores de ambos grupos de ratones implantados con la línea de neuroblastoma murino 36769. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM (p < 0.05) para cada uno de los grupos: control (n = 7) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

De ambas subpoblaciones (CD4+ y CD8+) se analizó su estado de activación temprano (OX40+, 4-1BB+) y continuado (PD1+, LAG3+, TIM3+) (**Figura 52**). En el subtipo CD4+, las células con activación tardía eran significativamente más abundantes en los animales tratados comparado con los controles, mientras que la diferencia no era estadísticamente significativa en los CD4+ activación temprana, aunque sí se apreciaba una tendencia en el mismo sentido. La tendencia se repetía de la misma manera en los CD8+ (tanto para activación reciente como sostenida), pero las diferencias no resultaron significativas. En cuanto al estado de diferenciación, existía mayor cantidad total de linfocitos T *naïve*, efectores y terminalmente diferenciados en ambos subgrupos, mientras que los linfocitos de memoria central no presentaban diferencias estadísticamente significativas.

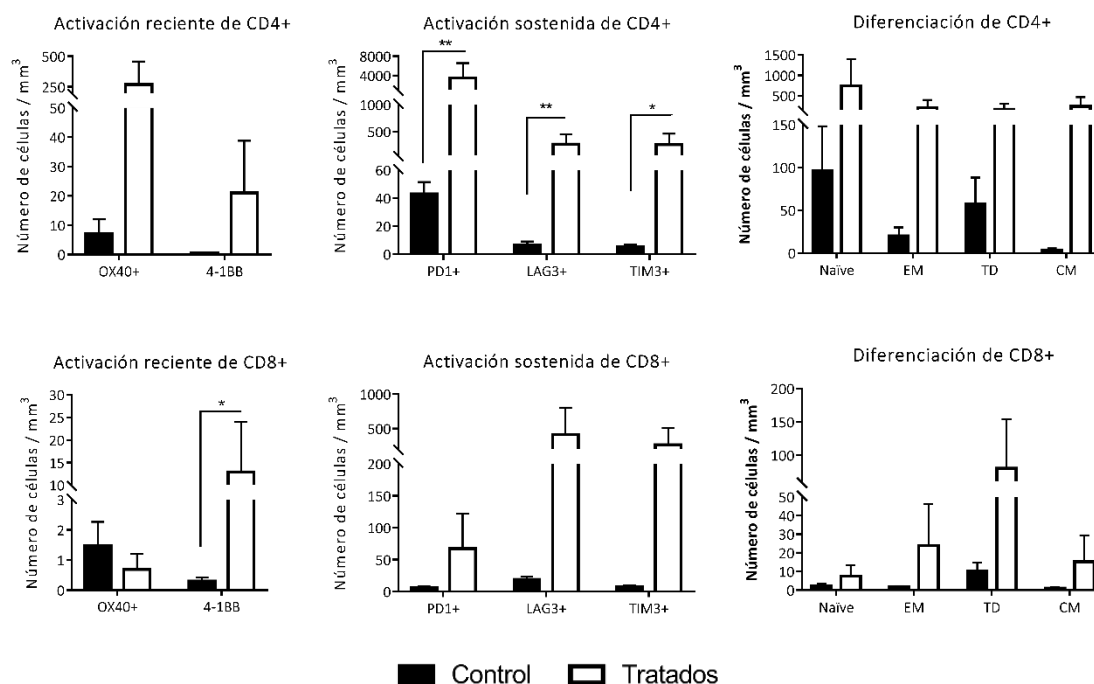


Figura 52: Linfocitos con diferentes estados de activación en los tumores de ambos grupos de ratones implantados con la línea de neuroblastoma murino 36769. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 7) y tratado con *mCelyvir* (n = 6). Las diferencias estadísticamente significativas se representan con * (p < 0.05) y ** (p < 0.01) (EM: *effector memory*, memoria efectora; TD: *terminally differentiated*, terminalmente diferenciado; CM: *central memory*, memoria central).

Las células mieloides estaban representadas por dos grandes grupos celulares: macrófagos y células mieloides supresoras (CD11B+) y células dendríticas (CD11C+). En estas subpoblaciones, las diferencias encontradas no resultaron ser estadísticamente significativas, aunque la tendencia a presentar mayor abundancia celular el grupo de animales tratados se mantenía.

Ambos grupos (CD11B+ y CD11C+) tendían a ser más abundantes en los tumores de los animales tratados con *mCelyvir* (Figura 53). Dentro de los macrófagos, aquellos con el fenotipo M2 eran más abundantes que los macrófagos con fenotipo M1 (clásicamente asociado a inflamación). Las MDSCs se dividieron en dos grandes grupos: granulocíticas y monocíticas; ambos subgrupos tendían a ser más abundantes en los ratones tratados con *mCelyvir*. Las células dendríticas (DCs) tampoco presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de ratones, pero igualmente presentaban tendencia a encontrarse en mayor abundancia en los ratones tratados. Las DCs, al igual que las MDSC, se dividieron en dos grandes grupos: plasmacitoides y convencionales; las primeras son más abundantes que las segundas en los ratones tratados con *mCelyvir*.

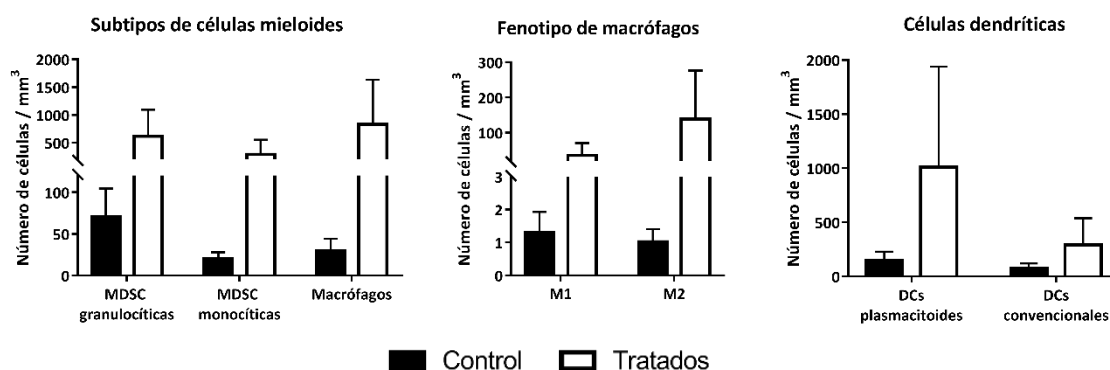


Figura 53: Diferentes tipos de células mieloides en los tumores de ambos grupos de ratones implantados con la línea de neuroblastoma murino 36769. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 7) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

4.3.2.4 – Estudio del microambiente tumoral en los ratones con neuroblastoma inducido.

Los tumores también se analizaron por qPCR para estudiar cambios en el microambiente tumoral en moléculas básicas relacionadas con inflamación y respuesta inmune (*Ccl2*, *Ifn γ* , *Il-10*) y con actividad del sistema inmune (*Arg2*, *Pd-l1*). Los resultados no mostraron apenas diferencias entre ambos grupos de ratones, y las diferencias que se aprecian no son significativas (**Figura 54**); un leve aumento en los niveles de expresión génica de todas las moléculas mencionadas aparecía en los ratones tratados con *mCelyvir*, salvo *Ifn γ* (que parecía presentar cierta tendencia a disminuir ligeramente).

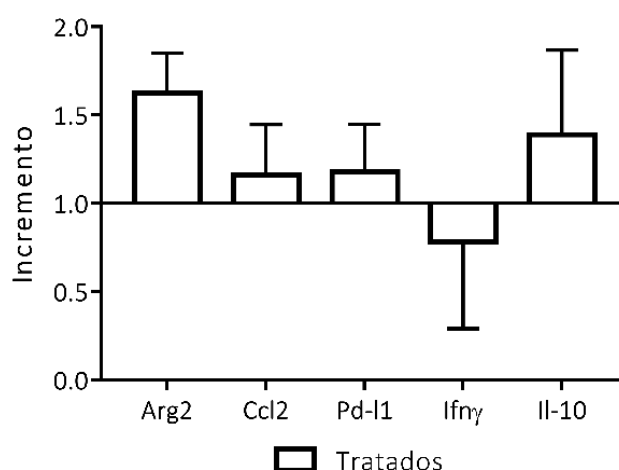


Figura 54: Análisis por RT-qPCR de las masas tumorales extraídas de los ratones con *mCelyvir*. El resultado se normalizó a los valores del grupo de ratones no tratados. Se representan las medias y el EEM para el grupo tratado con *mCelyvir* (n = 6).

4.3.3 – Modelo murino espontáneo.

4.3.3.1 – Terapia sistémica con Celyvir en modelo de neuroblastoma espontáneo.

El esquema de trabajo con estos animales fue ligeramente diferente del utilizado con el modelo inducido (Figura 55).

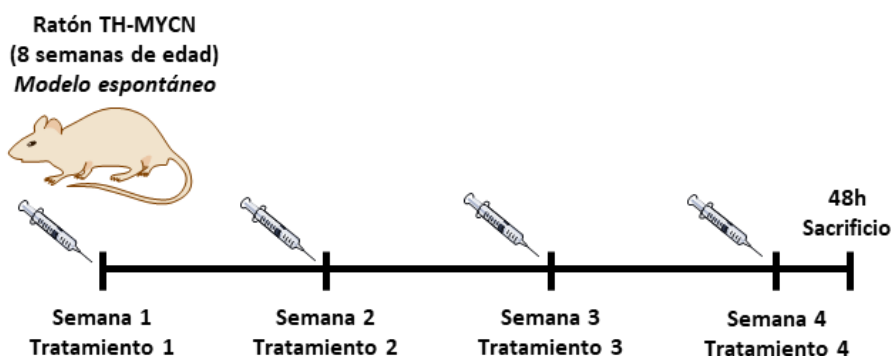


Figura 55: Esquema general del procedimiento experimental de los ratones TH-MYCN heterocigotos para el transgén. A las ocho semanas de edad se comenzó el tratamiento con *mCelyvir* (mMSC infectadas con el adenovirus murino MAV-1 dIE102). Se les administró una línea de tratamiento semanal intravenoso a MOI 200 (partículas físicas). A la cuarta semana los animales se anestesiaron, se exanguinaron y se sacrificaron, y se extrajo la masa tumoral para su posterior análisis.

4.3.3.2 – Los ratones heterocigotos para el transgén (TH-MYCN TG) presentan una generación tumoral del 40% y muy variable en el tiempo.

Se decidió utilizar a los animales que sólo presentaban el transgén en un alelo de su genoma, lo que introduce una gran variabilidad en los tiempos de generación tumoral que no se puede controlar, ya que los tiempos de generación del tumor dependen tanto del número de copias del transgén que el animal tenga, como de otros factores genéticos propios de cada animal.

Como ya se ha mencionado, no todos los animales heterocigotos desarrollan tumor (solo ocurre en el un 40% de los casos, ver Métodos), y el momento de generación de este tumor puede ser superior a las ocho semanas de vida. En nuestro caso, no existía posibilidad de hacer ningún tipo de análisis de imagen a cada animal para comprobar en qué momento desarrollaban el tumor, o simplemente, si lo generaban. La palpación de la masa tumoral tampoco es una opción en estos animales, puesto que el lugar de crecimiento del tumor es habitualmente sobre la zona paraspinal, esto es, sobre la arteria aorta y entre los dos riñones; la presencia del resto de órganos abdominales hace imposible la palpación hasta que el tumor es tan grande que compromete la vida del animal.

Por estos motivos, y ante la imposibilidad de realizar ningún tipo de seguimiento, se trató a todos los animales heterocigotos que cumplían las ocho semanas de edad, tanto machos como

hembras. En ese momento a los animales se les trataba con una dosis semanal de *mCelyvir* administrado por vía intravenosa, durante cuatro semanas. A las 48 horas tras la última dosis, se exanguinaron y sacrificaron los animales y se procesaron las muestras de sangre y el tumor.

El estudio de las poblaciones inmunes circulantes en la sangre periférica de estos ratones al final del tratamiento revela que no existían diferencias entre los animales no tratados (controles) y tratados con *mCelyvir* (Figura 56).

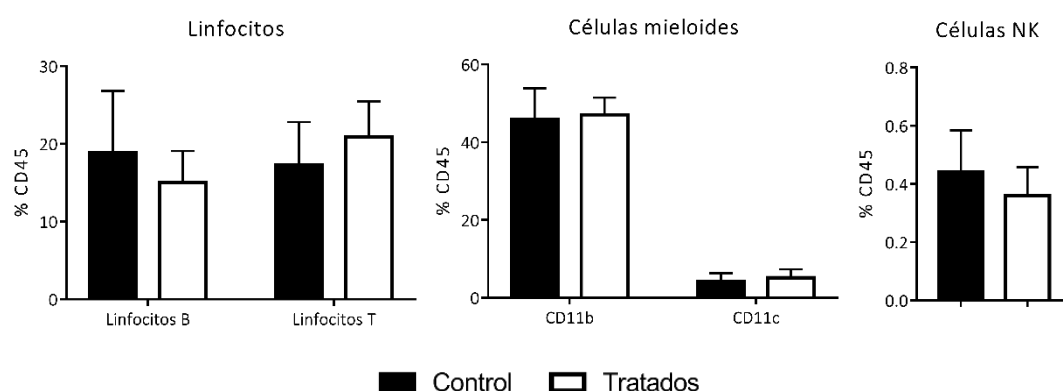
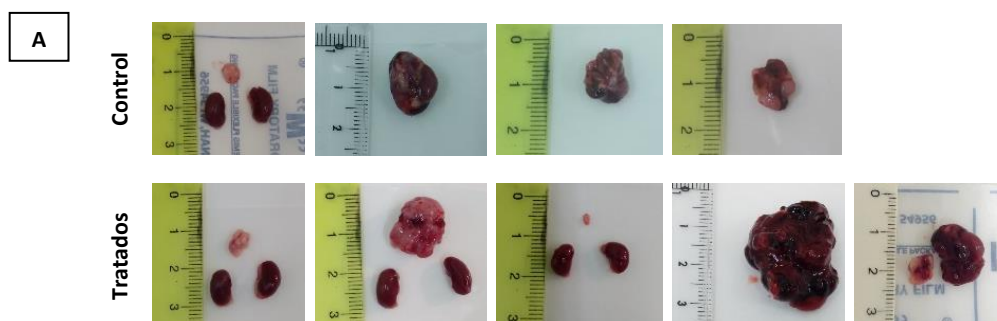


Figura 56: Poblaciones inmunes en la sangre periférica de los ratones heterocigotos para el transgén TH-MYCN. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM.

4.3.3.3 – Efectos locales en los tumores de ratones TH-MYCN tratados con Celyvir sistémico.

No se encontraron diferencias entre los tumores de los ratones tratados con *mCelyvir* (MOI 200) y los ratones control (Figura 57).



B

	ID	Ancho (mm)	Largo (mm)	VOLUMEN (mm ³)
Controles	A2	5	4	41,86
	A4	15	8	502,40
	A11	17	11	1076,50
	A18	9	6	169,56
	A19	10	7	256,43
mCelyvir (MOI 200)	B1	6	3	28,26
	B2	16	10	837,33
	B4	3	2	6,28
	B8	28	16	3751,25
	B10	10	9	423,90
	B12	14	10	732,66

C

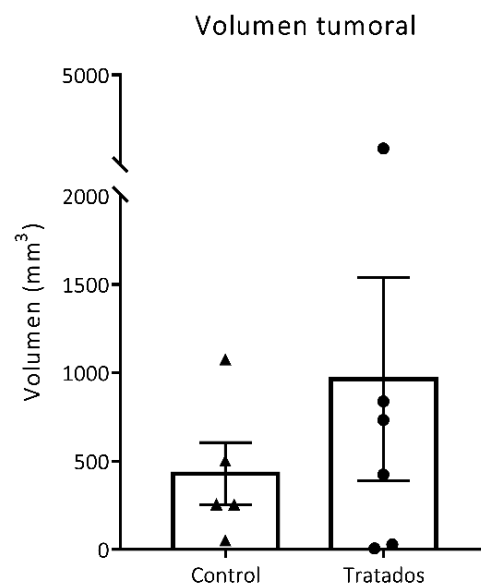


Figura 57: Comparativa de tamaños y volúmenes entre ambos grupos de tumores espontáneos (controles y tratados). **A)** Fotografías de los tumores en el momento de la extracción. Se muestra la masa tumoral y en algunos casos la comparativa con los riñones. A partir de las medidas se puede extrapolar el volumen aproximado de cada uno de los tumores. **B)** Volumen obtenido para cada uno de los tumores siguiendo la fórmula utilizada. **C)** Gráfica mostrando la media y el EEM para ambos grupos de animales. No existen diferencias significativas entre los tumores de ambos grupos.

4.3.3.4 – Estudio de los leucocitos infiltrantes de tumor en el modelo espontáneo.

Los resultados obtenidos al analizar la masa tumoral por citometría de flujo son similares a los obtenidos con el modelo murino inducido, aunque no detectamos diferencias significativas en a infiltración de leucocitos entre ambos grupos (**Figura 58**).

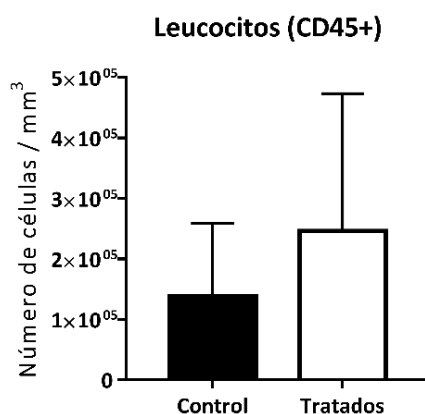


Figura 58: Número de células CD45+ por unidad de volumen en los tumores de los ratones TH-MYCN tratados y ratones TH-MYCN control. La diferencia entre ambos grupos no es significativa. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 5) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

En este caso también se estudiaron al detalle las subpoblaciones de leucocitos (CD45+) distinguiendo células linfoides y células mieloides (**Figura 59**). Ninguna de las diferencias observadas resultó ser estadísticamente significativa, pero existía cierta tendencia para cada subpoblación en cada uno de los grupos. Los linfocitos B y T tendían a ser más abundantes en los animales tratados, mientras que sucedía lo contrario en las subpoblaciones mieloides y en las células NK.

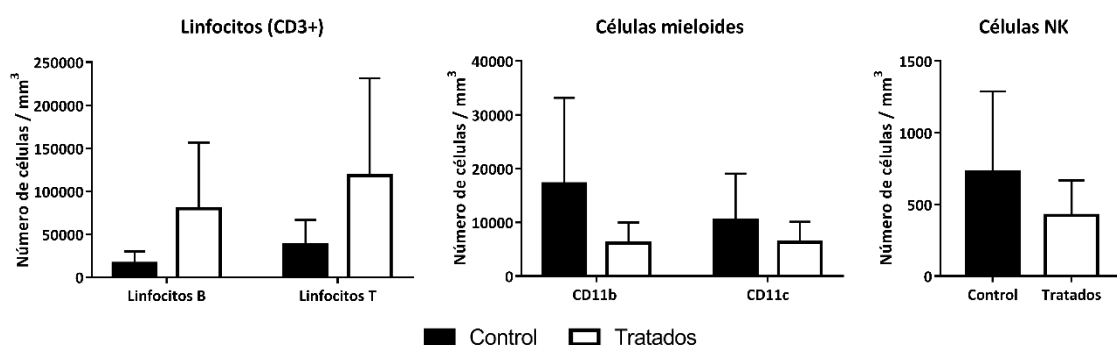


Figura 59: Linfocitos, células mieloides y células NK por unidad de volumen en los tumores de los ratones TH-MYCN tratados y ratones TH-MYCN control. La diferencia entre ambos grupos no es significativa. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 5) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

Al analizar con más detalle las subpoblaciones de linfocitos T, se encontró que la tendencia ($p < 0.1$) a poseer mayor cantidad de linfocitos T en los animales tratados se debe principalmente a los linfocitos T CD4+. En el caso de los linfocitos Tregs, la tendencia se encuentra invertida: se aprecia mayor abundancia de linfocitos Tregs en los animales no tratados, mientras que los Tregs apenas se ven representados en los animales tratados con *mCelyvir* (Figura 60).

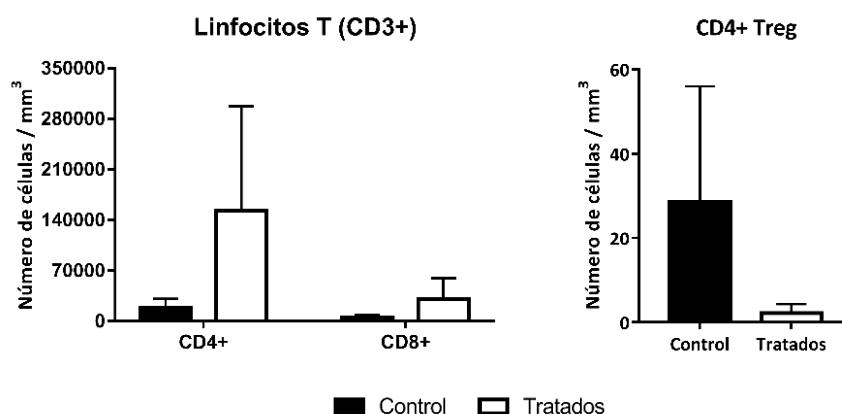


Figura 60: Linfocitos T (CD4+ y CD8+) y células CD4+ Treg por unidad de volumen en los tumores de los ratones TH-MYCN tratados y ratones TH-MYCN control. La diferencia entre ambos grupos no es significativa. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 5) y tratado con *mCelyvir* (n = 6).

Se analizó el estado de activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 61). No detectamos diferencias en los marcadores de activación reciente de los linfocitos en los animales tratados, pero sí en marcadores relacionados con activación sostenida, tanto de tipo CD4+ como CD8+. En cuanto al estado de diferenciación, encontramos diferencias en los linfocitos T CD4+ en todos sus estadios, mientras que en el caso de los linfocitos CD8+ las mayores diferencias se encontraron en los subtipos efectores (EM) y diferenciados (TD).

En el caso de las células mieloides, la tendencia fue la contraria a la que se apreció con los linfocitos: en los animales tratados con *mCelyvir*, todas las subpoblaciones mieloides tienden a disminuir su número comparadas con el grupo control (Figura 62). Los macrófagos de los animales tratados fueron mayoritariamente de fenotipo M1 (clásicamente definidos como efectores o proinflamatorios), aunque menos numerosos que en el grupo control. De manera similar, las células dendríticas fueron las de tipo convencional, mientras que las plasmacitoides apenas se detectaron en los ratones tratados.

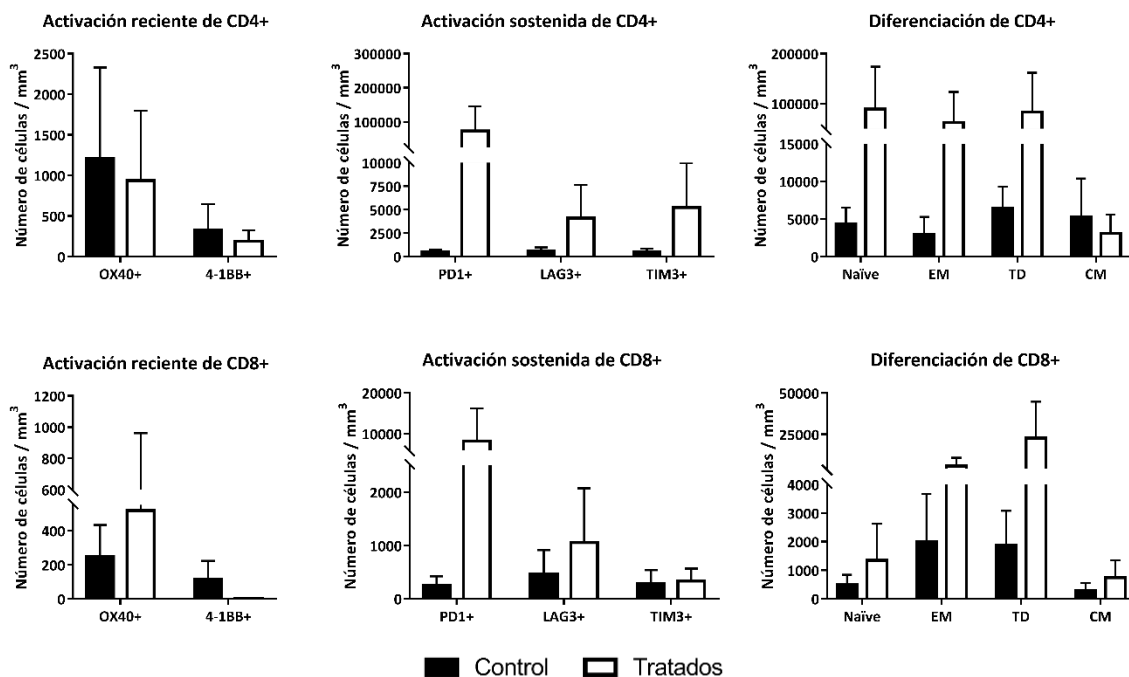


Figura 61: Linfocitos con diferentes estados de activación en los tumores de ambos grupos de ratones TH-MYCN tratados y ratones TH-MYCN control. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 5) y tratado (n = 6). (EM: *effector memory*, memoria efectora; TD: *terminally differentiated*, terminalmente diferenciado; CM: *central memory*, memoria central).

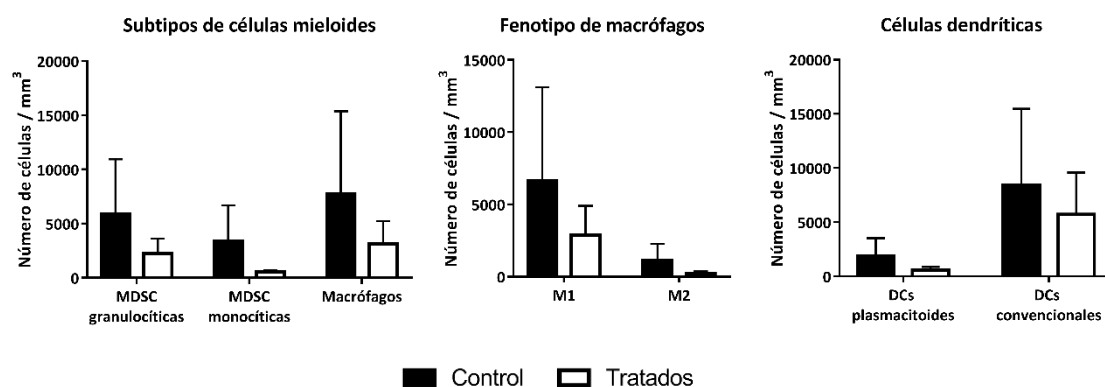


Figura 62: Diferentes tipos de células mieloides en los tumores de ambos grupos de ratones TH-MYCN tratados y ratones TH-MYCN control. Las barras negras representan los controles, las barras blancas representan los ratones tratados. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos: control (n = 5) y tratado (n = 6).

4.3.3.5 – Estudio del microambiente tumoral en los ratones TH-MYCN con neuroblastoma espontáneo.

El análisis de distintos genes relacionados con el estado del sistema inmune tumoral por qPCR aporta diferencias entre los distintos grupos (**Figura 63**). La expresión de *Ccl2* y de *Cxcl10* se incrementó (no significativamente) en los tumores de los ratones tratados con *mCelyvir*, mientras que la expresión de arginasa 1 (*Arg1*), arginasa 2 (*Arg2*, isoforma predominante en neuroblastoma), *Foxp3* (factor de transcripción asociado a linfocitos Treg), interleuquina 10 (*Il-10*), *Tgfβ*, *Vegf* y *Nos2*, disminuyeron significativamente respecto a los tumores de ratones control.

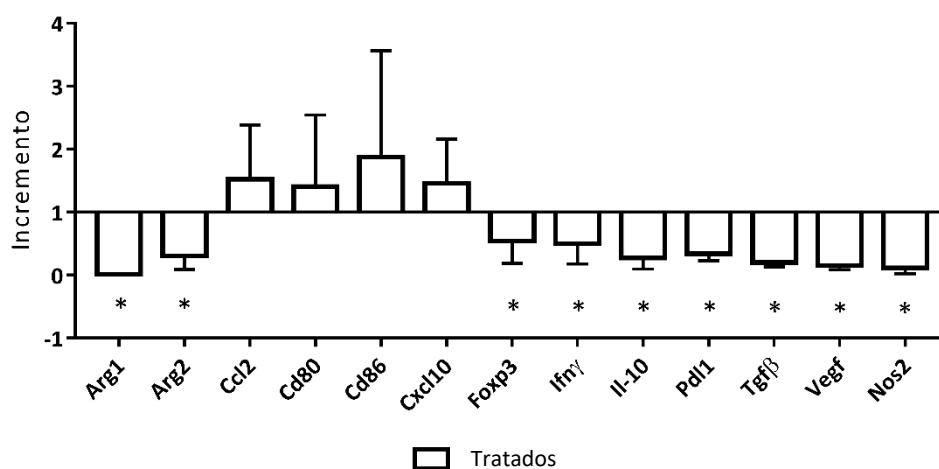
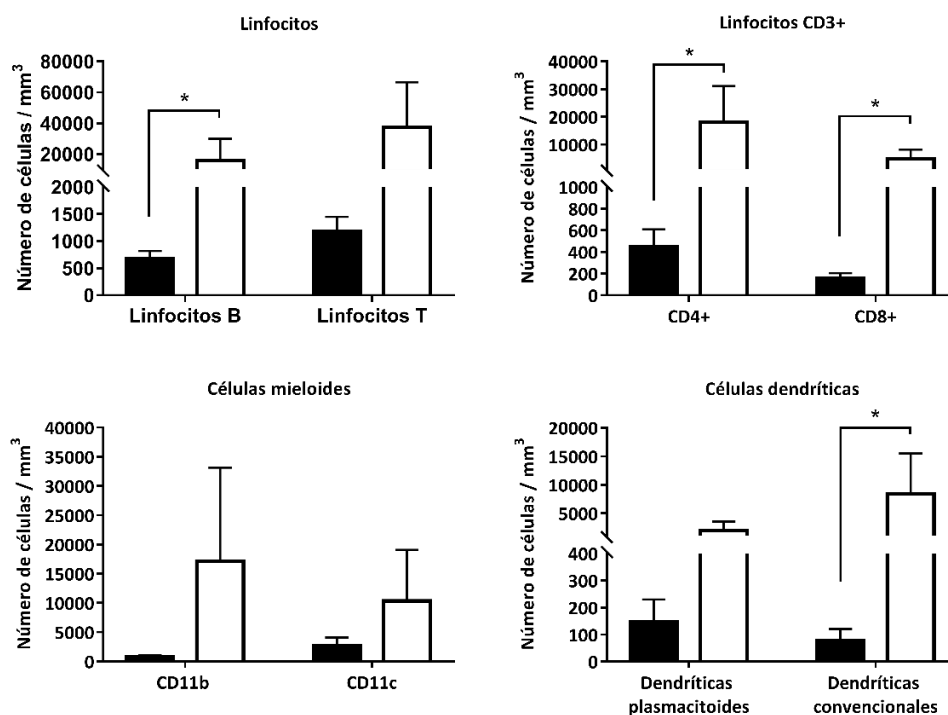


Figura 63: Expresión génica de los tumores espontáneos tratados a diferentes dosis de *mCelyvir*. El resultado se normalizó a los valores del grupo de ratones no tratados ($p < 0.05$).

4.3.4. – Comparación de la infiltración leucocitaria basal y el estado del microambiente tumoral entre ambos modelos murinos de neuroblastoma.

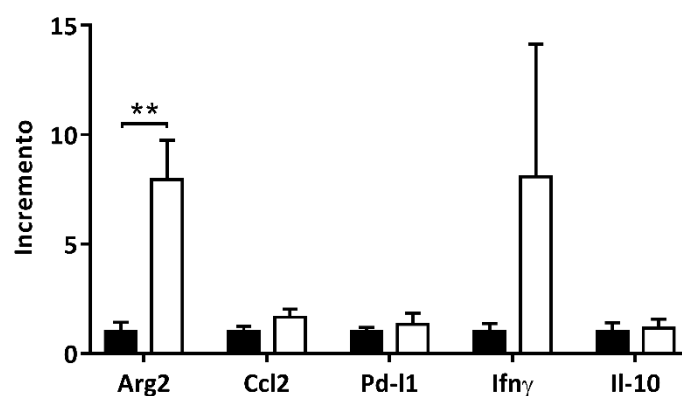
Se hizo la comparación de los parámetros obtenidos por citometría de flujo y qPCR de los tumores entre los ratones no tratados de ambos modelos (inducido, 129/SvJ; y espontáneo, TH-MYCN) (**Figura 64**). Comparando los resultados obtenidos de la citometría de flujo en los tumores de los ratones no tratados de ambos grupos, los tumores de los animales TH-MYCN (modelo espontáneo) poseían una infiltración basal por unidad de volumen tumoral mayor que los tumores de los animales no tratados del modelo inducido. En el caso de los linfocitos B, los linfocitos T CD4+ y CD8+, y las células plasmacitoides convencionales las diferencias fueron estadísticamente significativas.



■ Control inducido (129/SvJ)
 □ Control espontáneo (TH-MYCN)

Figura graficas 64: Comparación de las subpoblaciones inmunes principales entre los controles de ambos grupos de estudio en el modelo murino de neuroblastoma tratado con *mCelyvir*. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos ($p < 0.05$).

De manera similar, el estado del microambiente tumoral también poseía un perfil más inflamatorio de manera basal en los tumores de los animales controles TH-MYCN, que presentan mayor abundancia de genes relacionados con procesos inflamatorios comparados con los controles del modelo inducido (*Arg2*, *Ccl2*, *Pd-l1*, *Ifn γ* , *Il-10*) (**Figura 65**).



■ Control inducido (129/SvJ)
 □ Control espontáneo (TH-MYCN)

Figura 65: Comparación de la expresión de genes del microambiente tumoral entre los ratones no tratados de ambos grupos de estudio en el modelo murino de neuroblastoma tratado con *mCelyvir*. Se representan las medias y el EEM para cada uno de los grupos ($p < 0.01$).



5. – DISCUSIÓN

Celyvir es un medicamento innovador de terapia avanzada que combina dos elementos: células mesenquimales autólogas (del propio paciente) con un adenovirus oncolítico, ICOVIR-5¹¹⁷. El mecanismo de acción de *Celyvir* es doble: por un lado, el papel del adenovirus oncolítico ICOVIR-5, que tiene la capacidad de infectar y eliminar selectivamente las células tumorales¹⁰⁸; y, por otro lado, un efecto inmune, que procede tanto de la célula mesenquimal que lo porta como del asociado a la infección viral^{114,143}. Como ya se ha dicho, la viroterapia oncolítica puede considerarse una forma de inmunoterapia, ya que los beneficios clínicos reportados se han asociado con fenómenos antitumorales iniciados por procesos de infección y oncolisis^{144,145}. El papel del sistema inmune durante el tratamiento con virus oncolíticos tiene dos facetas distintas con un impacto directo en los resultados que pueda proporcionar la terapia. Por un lado, la inmunidad antiviral podría ser un impedimento importante para que se dé un resultado clínico; se ha descrito, por ejemplo, que las células NKs interfieren con la acción de los virus oncolíticos, disminuyendo e incluso eliminando su eficacia^{146,147}. Se sabe también que la inmunidad adaptativa ha desarrollado muchos mecanismos para eliminar las infecciones virales¹⁴⁸. Por otro lado, la oncolisis causa la muerte de las células tumorales con la posible liberación de antígenos asociados al tumor¹⁴⁹. Estos antígenos, junto con las señales de peligro asociadas a la infección viral, pueden estimular una respuesta inmune antitumoral que incremente el efecto clínico de manera significativa^{93,150}.

El hecho de que las MSCs se usen para la producción de *Celyvir* tiene implicaciones importantes en el desarrollo de las respuestas inmunes que ocurren en los pacientes, y eso hace a este tratamiento diferente a otros que usan viroterapia oncolítica sin administrarla a través de MSCs^{114,151}. Los efectos que las MSCs tienen sobre las células presentadoras de antígeno (CPAs incluyendo células dendríticas) y las células efectoras del sistema inmune son ya conocidos en la literatura^{152,153}. Asimismo, se ha reportado que las MSCs en un contexto autólogo, así como en modelos animales, pueden funcionar ellas mismas como CPAs^{154,155}. Por lo tanto, las MSCs que se utilizan para producir *Celyvir* podrían asumir un papel inmunomodulador, participar en la presentación antigénica, o en ambos procesos. En principio, las MSCs infectadas con vectores adenovirales no oncolíticos no han mostrado grandes cambios en sus características fenotípicas y funcionales^{156,157}. Desde el punto de vista de la práctica clínica con *Celyvir*, las MSCs podrían disminuir la respuesta antiadenoviral debido a su papel inmunomodulador, facilitando y por tanto incrementando la acción oncolítica del virus. Además, la administración de dosis repetidas del adenovirus (en el contexto de *Celyvir* se trata de dosis semanales) podría contribuir a la disminución de la respuesta inmune antiadenoviral por agotamiento de los linfocitos T antivirales, comparable con la que ya se ha descrito en otros pacientes con otras infecciones virales^{158,159}.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido profundizar en algunos aspectos fundamentales de esta terapia. Dado que las características de los pacientes tratados con *Celyvir* en nuestro programa de uso compasivo^{114,143,151} no explicaron las diferencias en la respuesta clínica, exploramos si podían existir factores intrínsecos de las células MSCs que determinen dicha

respuesta. Por otro lado, la mayoría de las respuestas clínicas positivas no se han mantenido en el tiempo, por lo que resulta importante conocer mecanismos de adaptación y resistencia tumoral al tratamiento con *Celyvir*. Por último, aunque el desarrollo clínico de *Celyvir* nos ha permitido incrementar considerablemente el conocimiento sobre esta estrategia terapéutica, necesitamos disponer de un modelo murino de tumor sólido infantil (en nuestro caso neuroblastoma) en el que estudiar efectos sistémicos y locales del tratamiento.

5.1 – Características biológicas de *Celyvir* asociadas a respuesta clínica.

Como ya se ha dicho, *Celyvir* es un medicamento compuesto por dos elementos¹⁵¹. Dado que el adenovirus oncolítico es un elemento común en todos los tratamientos, el elemento variable son las células mesenquimales, que al ser autólogas proceden cada una de un paciente y por tanto poseen características distintas. La principal razón por la que las MSCs que se infunden son autólogas es la seguridad biológica hacia los pacientes; en el primer estudio piloto, nuestro grupo demostró que el tratamiento era muy bien tolerado, no provocó ningún tipo de efecto adverso grave, y podía tener eficacia clínica¹¹⁷. En un segundo estudio en el contexto de un programa de uso compasivo, se comenzó a analizar las MSCs y el producto *Celyvir* derivado de doce pacientes adicionales. (Los resultados se publicaron en el año 2016 en la revista *Cancer Letters*.¹¹⁴) La variabilidad entre las MSCs puede obedecer a muchos factores, pero uno de los más importantes es que los pacientes recibieron diferentes líneas de tratamiento previas a someterse al tratamiento con *Celyvir*, que incluyeron cirugía, radioterapia y quimioterapia. Estos tratamientos pueden dañar la médula ósea de los pacientes, nicho del cual se extraen las MSCs para este tratamiento^{160–162}. Otro punto importante por el que las MSCs pueden ser diferentes entre sí es la propia variabilidad genética de los pacientes. Por lo tanto, según nuestras hipótesis, era posible que existieran MSCs con mayor capacidad de distribuir el virus de manera eficaz que otras.

A la hora de analizar las características de las MSCs a nivel molecular (génico y proteico), se optó por utilizar técnicas de transcriptómica y proteómica que permitieran adquirir una visión amplia desde el marco de la *Biología de Sistemas*. En la actualidad, la Biología de Sistemas (junto con otros métodos bioinformáticos) permite analizar una gran variabilidad entre muestras mediante herramientas matemáticas y gráficas, aportando los datos de manera interrelacionada y en un contexto de procesos biológicos que predicen el comportamiento de un conjunto de células en ese contexto. Es decir, es un método para integrar en un sistema interrelacionado lo que hasta hace no mucho sólo se podía inferir de la relación directa entre genes y proteínas de manera individual; esta interrelación se expresa a través de procesos biológicos conocidos formados por la integración de distintos subprocesos asociados a relaciones directas (*gen* –

proteína – función), que se han descrito previamente en la literatura a partir de procesos experimentales clásicos^{163,164}.

En una primera aproximación, acotamos los procesos que se mostraban como diferencialmente expresados entre ambos grupos. Dado el tamaño muestral, la primera fase del análisis se enfocó a generar hipótesis más que a obtener conclusiones definitivas, puesto que el poder estadístico era limitado. Los rangos de valores en algunas variables fueron tan elevados que exigieron la validación de los hallazgos iniciales mediante el estudio en una cohorte independiente de pacientes. Los estudios de secuenciación del transcriptoma y del secretoma de las MSCs encontraron diferencias en la expresión de moléculas entre los pacientes respondedores y no respondedores, que pudieron ser agrupadas en ocho procesos biológicos diferentes. Es interesante señalar que las MSCs de los no respondedores presentaban un perfil de expresión génica asociado a los procesos de fibrosis de la médula ósea, tejido a partir del cual se fabricaron dichas MSCs. De esta manera confirmamos nuestra sospecha de que los pacientes politratados con regímenes de altas dosis de quimioterapia presentan una limitación importante de inicio al considerar la terapia *Celyvir*, debido al daño acumulado en sus médulas óseas^{165,166}. Para este grupo de pacientes existe la alternativa de producir *Celyvir* a partir de MSCs de donantes sanos. O bien, proponer la recogida de un aspirado de médula autóloga al inicio del tratamiento de primera línea en los pacientes con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, de manera que se puedan producir MSCs en un tiempo posterior que no hayan sido dañadas por las altas dosis de quimioterapia o radioterapia. Otros procesos biológicos descritos en el análisis bioinformático identificaron diferentes genes en ambos grupos de pacientes, subrayando diferencias en las capacidades intrínsecas de las MSCs. Un ejemplo de ello es el perfil asociado a la adhesión celular. Nosotros ya habíamos comprobado diferencias a nivel de algunos receptores involucrados en procesos de migración y anidamiento, íntimamente relacionados con la adhesión intercelular¹¹⁴.

De todos los procesos obtenidos, dos nos parecieron especialmente relevantes en el contexto de *Celyvir*: los subprocesos que abarcaban todos los mecanismos relativos a la respuesta inmune frente a la infección por el adenovirus ("*Respuesta inmune frente al virus*"), y los que abarcaban todos los mecanismos que influían en la replicación adenoviral dentro de las MSCs ("*Replicación viral*"). Estos dos procesos globales se analizaron en más detalle mediante ANNs y se definieron así los distintos subprocesos que conferían las diferencias entre ambos grupos de pacientes; de cada uno de estos subprocesos se destacaron aquellos genes o proteínas que se expresaban de manera diferencial entre ambos grupos de MSCs infectadas y que, por lo tanto, constituían potencialmente marcadores biológicos de interés y que estaban íntimamente relacionados con la eficacia del tratamiento.

Respuesta inmune frente al virus

En el contexto de la "*Respuesta inmune frente al virus*", se identificaron como candidatos a partir del análisis del transcriptoma 5 genes (TRAF3, MAVS, PCBP2, FASN y NDRG1) que

estaban relacionados con tres subprocesos diferentes, y que se encontraban infraexpresados en el grupo de pacientes respondedores. Cuando se realizó la validación en una segunda cohorte de pacientes por PCR cuantitativa de estos candidatos, tres de ellos (TRAF3, PCBP2 y FASN) no mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión; por el contrario, para los genes NDRG1 y MAVS sí confirmamos una expresión significativamente menor en los pacientes respondedores de la segunda cohorte (Véase **Figura 14**). NDRG1 (*N-myc downstream-regulated gene protein*) es una proteína citoplasmática relacionada con respuestas al estrés, respuesta hormonal, crecimiento celular y diferenciación¹⁶⁷; en algunos tipos celulares puede actuar como supresor tumoral¹⁶⁸. Se ha descrito el papel de NDRG1 en el avance de la replicación de la gripe A durante a infección¹⁶⁹. Por otra parte, MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) es una proteína ubicada en la membrana mitocondrial y necesaria en las rutas de señalización por interferón estimuladas por virus¹⁷⁰, y se ha demostrado que contribuye a la inmunidad antiviral en las infecciones por virus de ARN de doble cadena^{170–172}. La presencia de MAVS se había descrito en células T, monocitos, células epiteliales y hepatocitos, pero hasta donde sabemos es la primera vez que se detecta su expresión diferencial en células mesenquimales de pacientes^{173–178}.

En cuanto a las proteínas secretadas relacionadas con este mismo proceso, se analizó el secretoma de esas mismas células mesenquimales de la segunda cohorte de pacientes. Se midieron los niveles de varias moléculas solubles cuyos niveles habían resultado diferencialmente expresados entre ambos grupos: IL-6, IL-10, IL-6R, IL-4 y MCP-1. En el caso de IL-6, el resultado de un paciente en el grupo respondedor aportaba gran variabilidad al grupo, con un valor medio mayor que el grupo de los no respondedores. No obstante, se incluyó en el proceso de validación, sobre todo por su relación con la expresión de MAVS (como se comenta más adelante). Tres de los cinco analitos (IL-10, IL-6R e IL-4) fueron indetectables, pero IL-6 y MCP-1 confirmaron la expresión diferencial entre ambos grupos de pacientes (Véase **Figura 15**). Ambas moléculas están implicadas, entre otras funciones, en la atracción de leucocitos^{179–183}. El papel de la interleuquina 6 (IL-6) y su interacción con el receptor (IL-6R) se ha descrito como dual, porque participa tanto en procesos proinflamatorios como antiinflamatorios¹⁷⁹ dependiendo del entorno en el que se la encuentre y de la señalización que intervenga en el proceso; de hecho, ya se ha descrito que IL6 tiene efecto sobre células mesenquimales de médula ósea de manera autocrina, a través de IL-6R¹⁸⁴ (tanto en su forma soluble como situada en la membrana). La molécula MCP-1 (también conocida como CCL2) está implicada mayoritariamente en la atracción y polarización de los macrófagos^{183,185}, y es también una de las quimioquinas más relevantes en el microambiente tumoral^{186,187}.

Los resultados de validación obtenidos en el estudio de la segunda cohorte son coherentes con lo que se conoce de la señalización de MAVS. Se ha descrito la relación entre IL-6 y CCL2 y MAVS^{170,188}, de tal manera que MAVS regula la expresión de IL-6 y CCL2 a través de la ruta de NF- κ B¹⁸⁸. Se ha demostrado la incapacidad de producir interferón en el contexto una respuesta antiviral en ratones *knockout* (deficientes) para MAVS (-/-)¹⁸⁹. Este papel de MAVS se

ha detectado en células inmunes (macrófagos y células dendríticas principalmente)^{172,190,191}, pero hasta donde nosotros sabemos, es la primera vez que se describe y se confirma este papel regulatorio de MAVS en células mesenquimales.

En conjunto, la baja expresión de estos dos genes y estas dos proteínas (resultado de la menor señalización vía los primeros) en los pacientes respondedores indicaba una menor señalización de la presencia intracelular de ICOVIR-5, o de una señalización retardada, con producción significativamente menor de mediadores de respuesta inmune. En cualquier caso, las MSCs de los pacientes respondedores presentaban un déficit en la estimulación del sistema inmune para que éste desarrollase una respuesta antiviral y, por tanto, una respuesta inmune hacia *Celyvir*. Esto permitía a las células mesenquimales migrar hacia los sitios tumorales sin ser neutralizadas por el sistema inmune del paciente al tiempo que ICOVIR-5 se replicaba en el interior de las MSCs. Una representación gráfica de la hipótesis sería la siguiente (**Figura 66**):

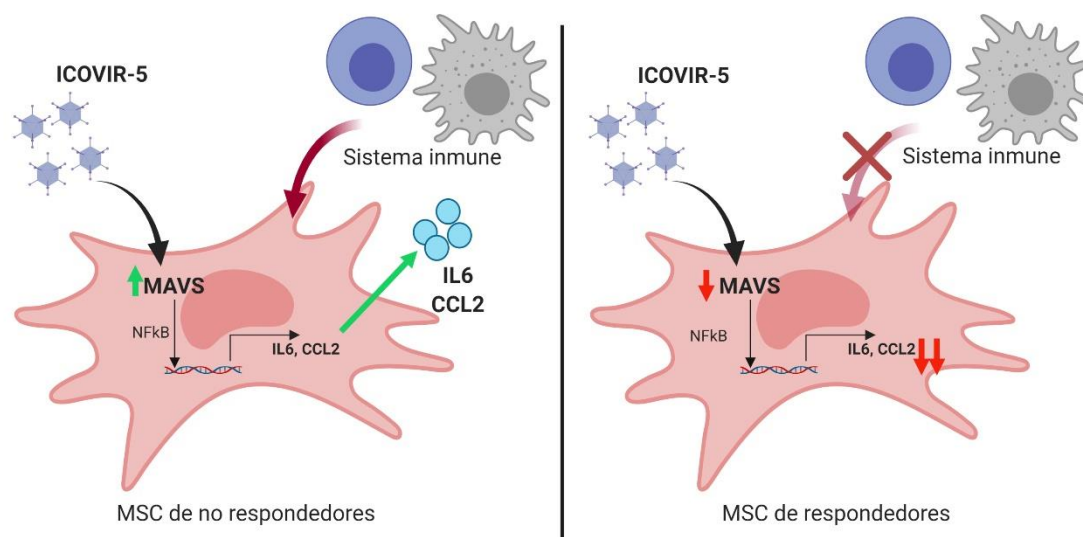


Figura graficas 66: Representación gráfica del modelo propuesto. (Imagen creada con Biorender.com.)

Replicación viral

La cuantificación de la capacidad funcional de la replicación viral por parte de las MSCs de ambos grupos de pacientes no mostró diferencias significativas; ambos grupos de pacientes mostraban una producción de partículas virales muy similar en momentos tardíos postinfección. Se decidió por tanto comprobar si los cambios detectados por el análisis de ANNs se confirmaban en la segunda cohorte de pacientes mediante PCR cuantitativa. De todos los genes diferencialmente expresados (un total de ocho), únicamente MAVS y BMPR1B mostraron diferencias significativas acordes con lo esperado según el análisis de ANNs. El papel y función de MAVS (que también era un gen diferencialmente expresado en este proceso) ya se han comentado en el apartado anterior. En cuanto a BMPR1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B*), es un receptor cuyos ligandos pertenecen a la familia de las proteínas morfogenéticas

de hueso (BMPs), y como tal, clásicamente se ha asociado siempre a enfermedades o disfunciones relacionadas con este órgano (condrodisplasia, braquidactilia, etc)^{192,193}. No obstante, en la literatura ya se ha mencionado su posible relación con procesos infecciosos; en un artículo publicado en 2018, Yan y colaboradores demostraron la expresión diferencial de BMPR1B durante la infección por el virus de la gripe A (*Influenzavirus A*)¹⁹⁴, algo que ya habían indicado König y colaboradores en el año 2010 al mencionar que BMPR1B tenía relación con la replicación viral¹⁹⁵; en el año 2012, Capitanio y Wozniak publicaron un resumen de todos los metaanálisis conocidos para el virus de la gripe A y de los factores que estaban implicados en su replicación y ciclo vital, y en los que BMPR1B también aparecía como gen necesario¹⁹⁶. Otra posibilidad es que BMPR1B se comporte en las MSCs estudiadas como receptor para el adenovirus oncolítico, siendo su mayor expresión en los pacientes respondedores un indicativo de una mayor eficacia de infección; esto ya se ha descrito para otras proteínas cuyo papel principal es diferente del asociado con los procesos virales¹⁹⁷.

Las MSCs de los pacientes respondedores presentaron un perfil más activo relacionado con el ciclo viral, tanto su replicación como su liberación. Es importante poner este resultado en el contexto de mayor actividad relacionada con mitosis celular también encontrado en el grupo de pacientes respondedores, puesto que la replicación de ICOVIR-5 en células no tumorales, como son las MSCs, depende de la existencia de un ciclo celular activo¹⁰⁸. La importancia de este hallazgo relacionado con una mayor permisividad de las MSCs a la replicación de ICOVIR-5 se demuestra en resultados clínicos de nuestros pacientes, en los que hemos comprobado ausencia de detección de ICOVIR-5 en sangre periférica en pacientes no respondedores¹¹⁴. La detección adenoviral en la sangre de los pacientes indica replicación en el tumor. Además, los pacientes respondedores presentan cantidades más altas de adenovirus circulantes respecto a los no respondedores en los que sí se detecta replicación viral, durante las primeras 6 dosis de tratamiento (resultados propios del grupo). Todos estos resultados clínicos subrayan la importancia de la replicación adenoviral en el interior de las MSCs como paso previo al beneficio clínico.

En resumen, este trabajo demuestra que el papel de las MSCs durante el tratamiento con *Celyvir* no es pasivo y que no se limita únicamente a actuar como un mero transporte del virus. La actividad inmunomoduladora de las MSC durante el tratamiento con *Celyvir* y su interacción con la replicación de las partículas virales son factores claves para el éxito de la terapia en el paciente. Estos conocimientos abren la puerta a la mejora del medicamento en el sentido de poder seleccionar MSC alogénicas más eficaces para los pacientes mediante un análisis de su perfil de secreción y de expresión génica. Otra alternativa es la de generar una línea inagotable de MSCs (inmortalización, diferenciación a partir de células madre pluripotentes inducidas, iPS) a la que se eliminan estos dos genes identificados (mediante tecnología CRISPR, por ejemplo). El hecho de fabricar *Celyvir* con MSCs de donantes también eliminará el daño acumulado por los tratamientos antitumorales que reciben los pacientes.

5.2 – Mecanismos de adaptación y escape tumoral al control clínico de *Celyvir*.

Presentamos aquí el caso clínico de una paciente con neuroblastoma metastásico refractario a varias líneas de tratamiento y tratada posteriormente con la terapia experimental *Celyvir*. Desde su diagnóstico y a lo largo de la evolución de su enfermedad, la paciente se sometió a los tratamientos estipulados por protocolo, que incluyeron varios ciclos de quimioterapia (COJEC, E-SIOP HR-NBL), no resultando eficaz ninguna de ellas. Dado el estado de progresión de la enfermedad, se decidió administrar *Celyvir* como uso compasivo como única terapia, consiguiendo una estabilización de la enfermedad. La paciente comenzó a someterse a una infusión semanal del tratamiento con *Celyvir*, durante el cual se le realizaron dos cirugías adicionales para proceder a una resección parcial del tumor abdominal primario. Cada una de las cirugías sirvió tanto para administrar localmente *Celyvir* de manera intratumoral como para obtener muestra del tumor primario. En la primera de las cirugías, la paciente aún presentaba respuesta al tratamiento y por tanto estabilización de la enfermedad. En la segunda cirugía, que se realizó más de un año después de la primera, la paciente ya no presentaba respuesta al tratamiento y la enfermedad se encontraba en progresión clínica. Disponer de ambas muestras nos ha permitido realizar un amplio estudio de las características del tumor entre ambos momentos del tratamiento, y estudiar las diferencias cuando había respuesta al mismo frente a la situación de progresión final. Para ello, nos hemos servido de las nuevas herramientas disponibles de secuenciación masiva y de análisis bioinformáticos de los datos obtenidos. De ambas muestras se secuenció tanto el exoma completo como el transcriptoma completo. Asimismo, se analizaron las secuencias correspondientes a la variedad de TCRs en ambos momentos de la enfermedad. Ambas muestras presentaron diferencias entre sí en todos análisis realizados.

El WES nos permitió analizar el exoma completo de la paciente en ambos momentos del tratamiento. Su comparación con la línea germinal (se utilizaron células mesenquimales sanas de la propia paciente) nos permitió detectar mutaciones adquiridas durante la enfermedad o el progreso del tratamiento. El análisis reveló que el número de mutaciones totales era mayor en la muestra final (169 mutaciones) comparándola con la muestra inicial (101 mutaciones). De todas ellas, sólo 55 mutaciones eran comunes a ambos tumores. Las 114 mutaciones adquiridas durante la progresión indican que a lo largo del tratamiento se acumuló mayor carga mutacional. Este hallazgo es esperable en el contexto de una neoplasia activa (no se consiguió el control mediante el tratamiento con *Celyvir*, sino sólo su estabilización) que mantuvo la inestabilidad genética intrínseca de las células tumorales humanas.

Los perfiles mutacionales encontrados durante la fase de control de la enfermedad y en el momento de la progresión final se analizaron mediante algoritmos bioinformáticos. La herramienta COSMIC definió un patrón de *signatures* o firmas genéticas características para

cada una de las muestras, revelando cambios genéticos del tumor durante el tratamiento. Dichos cambios afectaron a dos características principales en el momento de la progresión de la enfermedad: por un lado, una mayor inmadurez celular asociada a neuroblastoma, y por otro, una pérdida de características genéticas asociadas a la activación de las deaminasas AID/APOBEC debido a una infección viral.

En la literatura, está descrito que las deaminasas APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) son una amplia familia de proteínas características del sistema inmune innato, especialmente del de los mamíferos^{198–200}. Clásicamente, se activan en respuesta a interferón y están implicadas en la inhibición de la replicación viral²⁰¹. El hecho de que una firma genética relacionada con replicación viral desapareciese durante el estadio de progresión a pesar de la administración continuada de *Celyvir* apunta a una pérdida de respuesta inmune antiviral a nivel del tumor. Varios estudios recientes han demostrado que la infección viral de células tumorales puede activar la inmunidad antitumoral al estimular las vías de STING (*stimulator of interferon genes*) y provocar una respuesta inflamatoria^{202,203}. En nuestra paciente, la ausencia de respuesta AID/APOBEC en la progresión tumoral a pesar del tratamiento viral puede estar indicando una pérdida de los mecanismos inflamatorios antivirales presentes en el momento de estabilización.

Es posible que alguna o varias de las mutaciones que aparecieron durante los meses que la paciente estuvo recibiendo *Celyvir* fuesen responsables de la adquisición de resistencia a la terapia, contribuyendo a la progresión final. De entre todos los genes mutados, el gen CREG1 resulta particularmente atractivo como candidato a validación debido que reprime la actividad de la proteína E1A del adenovirus^{204,205}, y también controla la activación y represión de las rutas que inducen proliferación e inhiben diferenciación^{205–207}. Los programas de predicción establecen que esta mutación está situada en el dominio funcional de proteína. Estos programas también señalan a esta mutación como deletérea casi con total probabilidad, puesto que el residuo está muy conservado. Esta mutación no está descrita con anterioridad en bases de datos como COSMIC o cBioPortal (que son repositorios de mutaciones en cáncer), aunque sí están descritas otras mutaciones en el mismo gen. A nivel de estructura tridimensional, esta mutación parece desestabilizar la proteína.

CONDEL proporcionó además otras 26 mutaciones presentes durante la progresión tumoral y ausentes durante la estabilización clínica (**Tabla 14**). Aunque CREG1 nos pareció la mutación más interesante por el contexto en el que trabajamos y sus posibles implicaciones a nivel molecular y regulatorio en la biología del tumor (y por lo tanto será objeto de estudios más exhaustivos en proyectos de investigación futuros), es también interesante mencionar algunas de las mutaciones halladas y su posible implicación en la progresión clínica de la enfermedad.

- **DNase1** (*Deoxyribonucleasa 1*) parece estar implicada, entre otros procesos, en la muerte celular por apoptosis^{208,209}. Varios estudios han relacionado la actividad de la DNase1 con la muerte por apoptosis de las células tumorales tras aplicar tratamientos

quimioterapéuticos o inmunoterapia. Esta proteína interviene también en la degradación de la red antibacteriana y antiinflamatoria producida por los neutrófilos (*neutrophils extracellular traps*, NETs) y ayuda en condiciones fisiológicas a evitar obstrucciones de los vasos sanguíneos por coágulos²¹⁰. Se ha visto que la actividad de la DNase1 se encuentra disminuida en pacientes oncológicos a niveles de plasma comparado con un grupo control de pacientes sanos. Una mutación podría hacer más disfuncional a la proteína, evitando bien la apoptosis de las células tumorales o bien la actividad de los neutrófilos ante la inflamación producida por el tejido tumoral.

- **DNAH9** (*Dynein Axonemal Heavy Chain 9*) se ha descrito como gen clave en la interacción con la proteína 6 del linfoma de células B (BCL6)²¹¹ mediante técnicas de secuenciación en una cohorte de pacientes. BCL6 es una proteína esencial en el control de la proliferación de las células B, y se ha visto que su desregulación produce linfomagénesis²¹².
- El gen **UCLH1** (*Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1*) puede comportarse como represor tumoral o como oncogén dependiendo del tipo de tumor estudiado^{213,214}. En el caso del neuroblastoma, UCLH1 se ha descrito como biomarcador de la enfermedad mínima residual en la medula ósea y en la sangre periférica de estos pacientes²¹⁵. Más recientemente, el estudio de Gu y colaboradores ha descrito al gen UCLH1 como factor pronóstico favorable en el caso del neuroblastoma²¹⁶; la mutación de este gen podría asociarse a una función aberrante y por tanto a un mal pronóstico, como ya se ha propuesto para el caso de los gliomas²¹⁷.
- El gen **CELSR3** (*Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3*) codifica para un receptor con un papel importante en la señalización célula-célula durante la formación de tejido nervioso²¹⁸, y se ha detectado su expresión especialmente en células neurales diferenciadas, pero no en células madre neurales²¹⁹. Asimismo, se ha descrito su elevada expresión como valor pronóstico y diagnóstico para varios tipos de cáncer²²⁰. La expresión aberrante de este gen durante la progresión clínica de nuestra paciente podría estar implicada en la malignidad y proliferación tumoral del neuroblastoma, que procede de tejido nervioso.
- **RIPK2** (*Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2*) se ha descrito como gen implicado en la regulación de la respuesta inmune a través de NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) vía NF- κ B²²¹⁻²²³. La inhibición de RIPK2 o de NOD2 produce una atenuación de la respuesta inmune en diversos modelos de ratón²²⁴. En un modelo de pez cebra, se ha visto que la interacción del eje RIPK2/NOD2 con MAVS a través de la ruta de NF- κ B interfiere en la respuesta inmune antiviral, de tal manera que la inhibición o disminución de NOD2 produce una disminución de este tipo de respuesta inmune²²⁵. Este eje resulta particularmente interesante en este trabajo, ya que MAVS también se ha obtenido como gen clave en el comportamiento de las MSCs

en el contexto de *Celyvir* (ver apartado anterior). Una revisión bibliográfica más exhaustiva podría empezar a esclarecer la relación entre ambos procesos.

- El gen **IQGAP1** (*IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*) codifica para una proteína relacionada íntimamente con el citoesqueleto, con otras moléculas de adhesión y con procesos de movilidad y morfología celular^{226,227}. Su expresión exacerbada se ha relacionado con la progresión de diversos tipos de cáncer y mal pronóstico^{228–230}. En el caso de tumores pediátricos, IQGAP1 se ha relacionado con un aumento de la motilidad de las células de neuroblastoma²³¹. Estos hallazgos conjuntos podrían suponer un aumento de la invasividad y malignidad del neuroblastoma de nuestra paciente en lo que respecta a la presencia de esta proteína.
- El gen **LRP1B** (*LDL Receptor Related Protein 1B*) también apareció como mutado durante la progresión tumoral. Ya se ha descrito este gen como supresor tumoral^{232,233} y sus mutaciones se han asociado a mal pronóstico en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer colorrectal²³⁴, adenocarcinoma pulmonar²³⁵ y melanoma²³⁶, entre otros. En resumen, LRPB1 es uno de los genes más mutados en cualquier tipo de cáncer, y su presencia como gen mutado dentro de la muestra de la paciente podría estar asociada con el mal pronóstico de la enfermedad en aquel momento.
- **TRPV6** (*Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, member 6*) es un canal de señalización por calcio cuyas mutaciones y señalización excesiva se han asociado clásicamente a estados avanzados de diversos tipos de tumores (próstata, colon, mama, tiroides y carcinomas de ovario, entre otros^{237,238}). En el caso del neuroblastoma, la inhibición de TRPM7 (otro canal de calcio perteneciente al mismo grupo, pero no a la misma familia) produjo un descenso en la capacidad invasiva y divisoria de células de neuroblastoma²³⁹.
- Otras de las mutaciones señaladas por CONDEL se corresponden con genes que de manera clásica ya se han asociado a procesos tumorales: **GALNT15** (*Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 15*) es una proteína que pertenece a la familia de las N-acetilgalactosaminiltransferasas y su expresión es común en diversos tipos de cáncer²⁴⁰, mientras que **ASIC5** (*Acid Sensing Ion Channel Subunit Family Member 5*) es una proteína expresada de manera mayoritaria en tejido nervioso (principalmente cerebral)²⁴¹. **ABHD2** (*Abhydrolase Domain Containing 2*) promueve la proliferación y la migración del cáncer de próstata²⁴². La pérdida de **AGL** (*Amylo-Alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase*) aumenta el crecimiento tumoral en cáncer de vejiga²⁴³ y pulmón²⁴⁴. Por último, La expresión exacerbada de **PABPC1** (*Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1*) también promueve el crecimiento tumoral en tumores gástricos²⁴⁵.

Además de poder alterar directamente la función de genes importantes en la acción oncolítica de ICovir-5, la adquisición de mutaciones puede modular indirectamente la respuesta inmune antitumoral^{246,247}. El repertorio mutacional de un tumor puede contener neoantígenos, resultado de mutaciones incluyendo las denominadas no sinónimas (*Single*

Nucleotide Variants, SNVs)²⁴⁸, es decir, aquellas en las que el cambio de un único nucleótido provoca una alteración en la secuencia de aminoácidos. Dichas alteraciones pueden traducirse en cambios conformacionales en las proteínas, que si posteriormente son presentadas por moléculas HLA, pueden ser reconocidas por el sistema inmune y, por tanto, susceptible de ser eliminada²⁴⁹. La predicción de neoantígenos se consiguió cruzando los datos de las mutaciones no sinónimas (WES) expresadas por el tumor (resultados de RNA-Seq), con los HLAs conocidos de la paciente. Mediante la aplicación web NetMHC se pudieron identificar aquellas SNVs con más probabilidad de constituir neoepítopos en las muestras tumorales. Los resultados de este análisis mostraron acumulación de mayor número de posibles neoantígenos en la muestra correspondiente a la progresión de la enfermedad comparándola con la muestra obtenida en el momento en que existía estabilización. Es decir, el análisis reveló que la muestra final podía ser en principio más antigénica que la muestra inicial. En la paciente, la mera presencia de un mayor número de neoantígenos, posibles dianas para un ataque inmune antitumoral, no se correspondió con una mejor respuesta clínica. Existen diversas explicaciones posibles a este hecho, algunas de las cuales se abordan en los siguientes párrafos. Una de las más frecuentes es la pérdida de expresión de las moléculas HLA presentadoras de los neoepítopos, o de la maquinaria asociada a la presentación antigénica, fenómeno bien descrito en cáncer humano²⁵⁰. En nuestro caso este mecanismo no contribuyó a la progresión de la enfermedad. No pudimos realizar ningún ensayo con linfocitos de la paciente que nos ayudase a validar alguno de estos candidatos a neoepítopos por no disponer de tejido fresco.

Secuenciamos el transcriptoma en ambos momentos de la enfermedad y analizamos los resultados para conocer los paisajes inmunes predominantes en cada muestra. Este punto es muy importante en el contexto del resultado de una inmunoterapia^{251,252}. Los análisis con diferentes algoritmos, Immunoscore y QuanTiSeq, revelaron que la muestra obtenida en el momento en que existía respuesta clínica poseía significativamente mayor número de células inmunes que el tumor durante la fase de progresión. Esto se debía principalmente a la presencia de linfocitos B, linfocitos T y células dendríticas. La única población inmune que era más abundante en la muestra final fueron los monocitos. Estos resultados parecen indicar mayor actividad del sistema inmune adaptativo en el momento en que la paciente experimentaba una respuesta clínica positiva.

Con objeto de ampliar el estudio de las subpoblaciones inmunes en nuestras muestras, nos servimos de la herramienta CIBERSORT. Gracias a ella pudimos identificar subpoblaciones que con el Immunoscore y el QuanTiSeq sólo podíamos definir a grandes rasgos. La presencia de linfocitos B era dominante en la muestra inicial, componiéndose mayoritariamente por células B *naïve* y células B memoria. Los linfocitos T mayoritarios fueron linfocitos T (CD4+) memoria. En esta muestra también predominaban los macrófagos M2 en lo que respecta al componente mieloide. En cambio, la muestra de la progresión tumoral presentaba subpoblaciones inmunes diferentes. Como principal componente de los linfocitos B aparecen las

células plasmáticas. Los linfocitos NK también aparecen más representados, mientras que el componente mieloide se nutre principalmente de macrófagos M0 y M1.

La presencia de las poblaciones inmunes principales también se correspondía con perfiles de quimioquinas responsables del reclutamiento de las mismas, como fue el caso de las relacionadas con linfocitos B y células dendríticas en el momento de estabilización de la enfermedad.

El análisis bioinformático de los datos del transcriptoma mostró un enriquecimiento relativo de linfocitos T en el tumor durante su estabilización comparado con el momento de progresión. Se incluían aquí los linfocitos T CD8, subpoblación que contiene los linfocitos T efectores antitumorales clásicos²⁵³. El ambiente de quimioquinas mostró un enriquecimiento en moléculas relacionadas con el reclutamiento de linfocitos T activados durante la progresión, como también sucedió con moléculas relacionadas con actividad citolítica de linfocitos T y células NK. Los linfocitos T que infiltraban el tumor en la fase final de la enfermedad presentaron mayor expresión de marcadores de activación crónica, asociada a agotamiento funcional de dichas células^{254,255}. Este punto fue comprobado mediante cuantificación de la expresión de genes de los receptores clásicos de agotamiento de linfocitos T (PD1, LAG3 y TIM3) y la de sus ligandos²⁵⁶. La situación intratumoral en el estadio final de la enfermedad apuntaba a presencia de TILs funcionalmente agotados en un microambiente tumoral induciendo dicho agotamiento.

El análisis centrado en linfocitos T se completó con la cuantificación del repertorio de TCRs presentes en cada una de las muestras. Encontramos un mayor número de reordenamientos clonales en la muestra correspondiente a la progresión final de la enfermedad frente a la estabilización. Un porcentaje menor de reordenamientos ya estaban presentes en la muestra inicial y seguían detectándose durante la progresión, sugiriendo la infiltración continuada por los mismos clones infiltrantes del tumor. De todos los TILs detectados durante la fase de estabilización, los clones con mayor representación fueron los que formaban parte de los TILs finales, y su presencia podía sugerir la persistencia de los antígenos que reconocían dichos TCRs. El incremento en el repertorio TCR de los TILs durante la progresión de la enfermedad sugería una infiltración de TILs más diversa a medida que la enfermedad avanzaba. La distribución relativa de clones apuntaba a una progresión con pocos clones de TILs dominando el paisaje tumoral en la fase final de la enfermedad. Desgraciadamente no pudimos realizar ningún ensayo funcional para estudiar la reactividad de los TILs de las muestras tumorales.

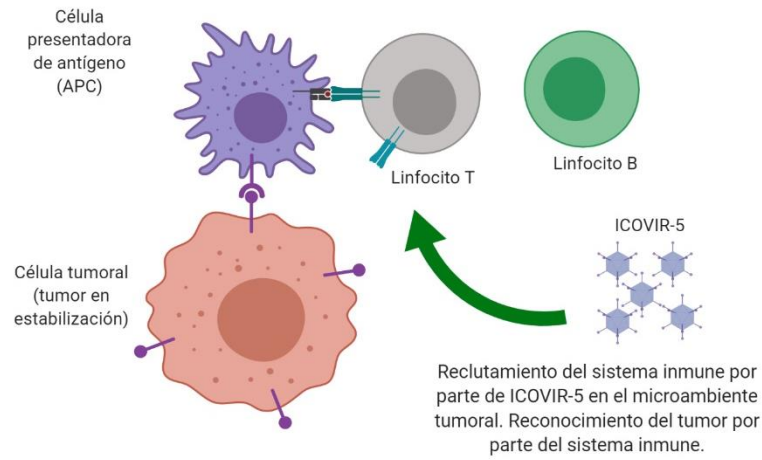
Otros autores han identificado hasta seis perfiles moleculares y genéticos diferentes entre miles de muestras tumorales analizadas con técnicas de secuenciación masiva. Según Thorsson y su equipo, cada uno de los perfiles (C1 a C6) presentaba características propias que los diferenciaban del resto y se asociaban a distinto pronóstico clínico²⁵⁷. Thorsson identificó un perfil C2 caracterizado por una gran variedad de TCRs (algo que no se asocia a respuesta clínica), y por la presencia de IFN γ y de CXCL10. Este perfil era, además, uno de los que más infiltrado leucocitario presentaba, representado sobre todo por linfocitos CD8+ y macrófagos M1. A pesar

de que estas características se asocian clásicamente a una buena respuesta clínica, esto no se cumplía en el caso de los tumores C2. En nuestro caso, los resultados del RNA-Seq y el análisis de los TCR de la muestra obtenida durante la estabilización asociada al tratamiento inicial con *Celyvir* revelaron un perfil similar a los tumores clasificados como C2 (alta variedad de TCRs, presencia de IFN γ , alto infiltrado inmune).

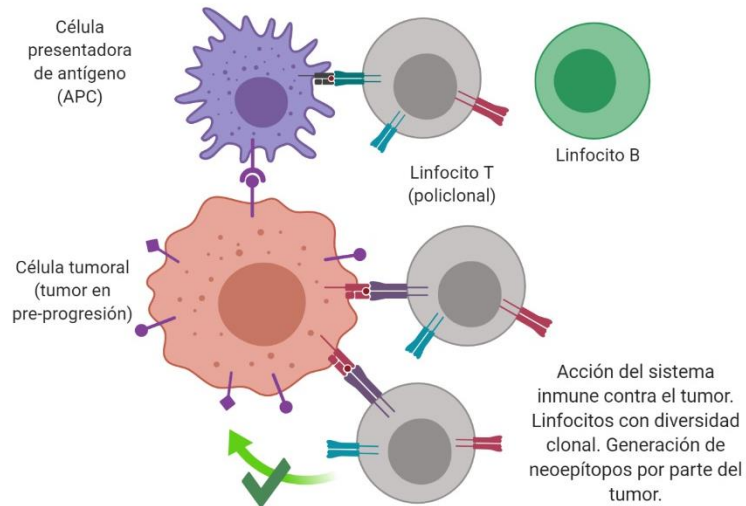
Integrando la información acumulada en los análisis anteriores, la progresión clínica de la enfermedad que supuso el escape tumoral del control inmune asociado al tratamiento con *Celyvir*, se acompañó de mayor carga mutacional, posiblemente mayor número de neoepítopos en un tumor sin déficit para la presentación antigénica, que fue infiltrado por una variedad mayor de clones de linfocitos T, que presentaban un fenotipo reconocido como de agotamiento funcional, infiltrando un microambiente tumoral que activamente inducía dicho agotamiento. Un esquema de la situación se puede visualizar en la **Figura 67**. La contribución relativa de las células del sistema inmune adaptativo fue decayendo durante la evolución a favor de subpoblaciones mieloides, clásicamente asociadas a un efecto protumoral del microambiente. Nuestra hipótesis apunta a que el tratamiento fue efectivo en principio, en un momento en el que las células inmunes eran reclutadas por acción de ICOVIR-5 y, una vez allí, éstas eran capaces de combatir el tumor. Sin embargo, a lo largo del tiempo de tratamiento y su consecuente estabilización, el tumor fue adquiriendo una serie de nuevas mutaciones y características moleculares que hicieron que finalmente el sistema inmune no fuera capaz de seguir manteniendo el equilibrio y que la enfermedad progresara. Muchas de las mutaciones que adquirieron las células tumorales dieron lugar a nuevos neoepítopos, que se hicieron más abundantes en el momento de la progresión. El sistema inmune de la paciente respondió a esta mayor variedad antigénica reclutando linfocitos con mayor diversidad de TCRs, pero su estimulación crónica derivó en agotamiento funcional. Sin embargo, otras muchas mutaciones adquiridas por el tumor no dieron lugar a nuevos antígenos sino a cambios funcionales y moleculares en las propias células tumorales que las hicieron más resistentes a la acción de la respuesta inmune y la acción oncolítica de ICOVIR-5, probablemente a nivel de factores de transcripción que activaran rutas de supervivencia alternativas.

El estudio de estas diferencias indicaba que el entorno tumoral de la paciente cambió a lo largo del tratamiento, pasando de tener un fenotipo más proinflamatorio a uno más antiinflamatorio. Las distintas subpoblaciones inmunes que hemos identificado gracias a diversas herramientas bioinformáticas nos permitieron reconocer los tipos celulares que más contribuyeron con este cambio. Destacaron los linfocitos B, siendo más activos e importantes en el momento de respuesta al tratamiento que en el momento de la progresión. Los linfocitos B constituyen la principal fuente de inmunoglobulinas²⁵⁸ y pueden actuar como CPAs y estimular a los linfocitos T^{259–261}. El papel de las células B no está muy estudiado en los tumores sólidos infantiles, pero podría constituir una población inmune clave como factor pronóstico o a tener en cuenta para el éxito del tratamiento con *Celyvir*. Los linfocitos B son una parte esencial de la

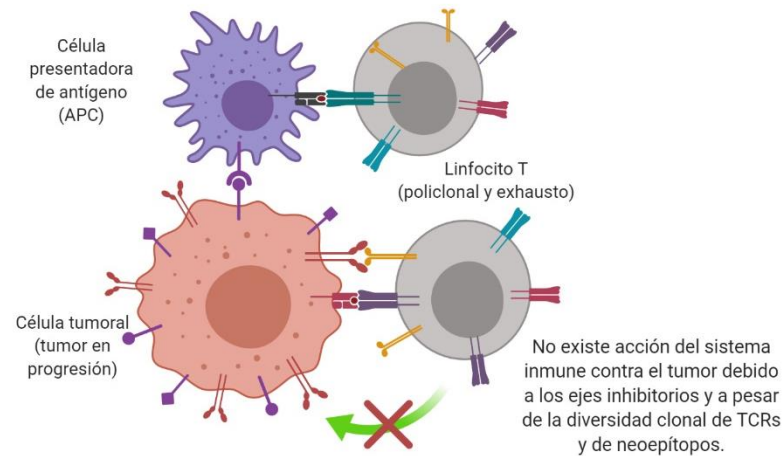
A. FASE DE ESTABILIZACIÓN CLÍNICA



B. FASE DE PRE-PROGRESIÓN



C. FASE DE PROGRESIÓN CLÍNICA



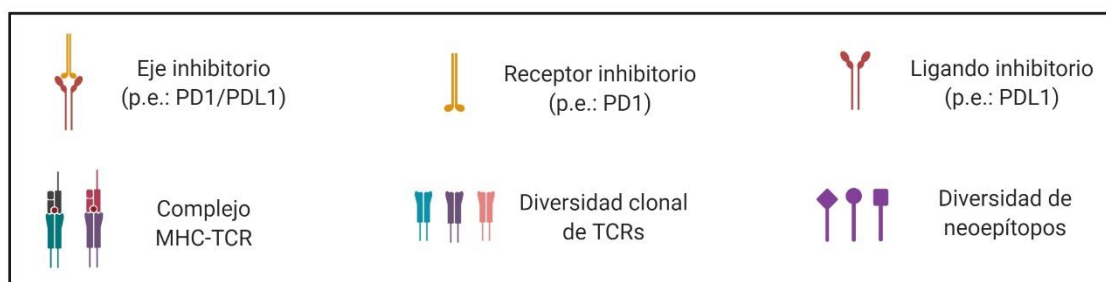


Figura 67: Situación biológica propuesta durante el estado de progresión tumoral de la paciente. A pesar de la diversidad clonal de TCRs, los linfocitos T se encontrarían en un estado de agotamiento o inhibición que impedirían su acción contra el tumor, a pesar de la expresión de neoepítomos y presentación antigénica por parte de la célula tumoral. (Imagen creada con Biorender.com.)

respuesta inmune humoral y su función principal ha sido clásicamente la secreción de anticuerpos en respuesta a la exposición de antígenos²⁶⁰. Asimismo, las células B secretan gran cantidad de citoquinas y pueden actuar como células presentadoras de antígeno^{262,263}. Ante una infección, las células B *naïve* derivan en su mayoría a células plasmáticas, encargadas principalmente de producir los anticuerpos, aunque un pequeño porcentaje permanece como células B memoria²⁶⁴. Se han identificado subtipos de células B similares a los subtipos de células T que se encuentran infiltrando los tumores y, al igual que ocurre con los linfocitos T, cada subtipo está asociado a un perfil molecular diferente^{265–268}. En el caso de esta paciente, mientras que en la muestra inicial el componente celular B se componía de células memoria y células *naïve*, en la muestra final el conjunto de linfocitos B era significativamente menor y se componía mayoritariamente por células plasmáticas.

5.3 – Modelo murino de *Celyvir*

En esta tesis doctoral se ha presentado un modelo murino de neuroblastoma que recapitula los procesos principales del modelo humano y que permite el estudio de muchos aspectos importantes relacionados con la estrategia terapéutica *Celyvir* que se está desarrollando en niños con cáncer. El ratón transgénico TH-MYCN reproduce las principales características clínicas y genéticas del neuroblastoma con el oncogén MYCN amplificado¹¹⁸. Este ratón se ha utilizado en los últimos 20 años en numerosos estudios de biología básica e investigación preclínica relacionados con esta enfermedad²⁶⁹. Un aspecto que, por el contrario, no ha sido tan exhaustivamente estudiado en este modelo es el perfil de las células infiltrantes del tumor de estos animales, tanto a nivel basal como tras la administración de los tratamientos. Este punto es muy importante en el contexto de las inmunoterapias, como es el caso de *Celyvir*. El ratón TH-MYCN es un animal inmunocompetente y los tumores se desarrollan en un tejido y un microambiente apropiados, con lo que se reproducen en estos animales las condiciones que permiten la interacción del sistema inmune con el tumor en desarrollo.

Se ha tratado a estos ratones con un régimen terapéutico similar al que se usa en los pacientes pediátricos¹¹⁷, es decir, con un tratamiento sistémico que consiste en un adenovirus oncolítico murino portado por una célula mesenquimal murina (*mCelyvir*). Al igual que en los pacientes, en los ratones se ha confirmado una excelente seguridad en lo relativo a esta terapia, sin efectos adversos ni signos de malestar en los animales.

Cuando se ha comparado con el virus desnudo, las infusiones repetidas de *mCelyvir* resultaron en una mayor acumulación del adenovirus en órganos como el bazo y el pulmón, debido probablemente al efecto de filtrado que ejercen estos órganos para las células infundidas^{270–274}. Igualmente, *mCelyvir* resultó también en una acumulación más elevada de virus en las masas tumorales si se comparaba con la infusión de partículas virales desnudas, lo que demuestra que las células mesenquimales mejoran la administración y llegada del tratamiento al tumor y a otros órganos. Estos resultados podrían indicar que *Celyvir* puede localizar y anidar en tumores que metastatizan en los pulmones, como ocurre con los sarcomas pediátricos y algunos carcinomas adultos. La protección con que las MSC proveen al adenovirus oncolítico no impide el desarrollo de una respuesta inmune antiadenoviral, lo que se ha manifestado en nuestros resultados (**Figuras 42 y 43**). Sin embargo, la presencia de anticuerpos antiadenovirales circulantes no evitaron los cambios detectados en las masas tumorales.

Menos de la mitad de los ratones transgénicos TH-MYCN desarrollaron tumor durante el tiempo experimental, y muchos de los que lo hicieron fallecieron antes de poder obtener resultados, como se ha descrito ya en la literatura¹¹⁹. Además, el tiempo de inicio del tumor no es homogéneo en este modelo espontáneo de neuroblastoma. La mayoría de los ratones que desarrollaron tumores lo hicieron durante las semanas 6 y 9 de vida, predominantemente en la región paraespinal. Esto significa que los tumores sólo podían palpase cuando habían alcanzado un tamaño lo suficientemente grande y por tanto era muy difícil detectar por este método cuándo se iniciaba la masa tumoral, ya que la medición (con instrumentos como un calibre externo) era imposible. De igual modo, no se disponía de un sistema de imagen que permitiera el seguimiento del desarrollo de estos tumores y por tanto poder elegir el mejor momento para comenzar el tratamiento en cada ratón. Todos estos factores impusieron limitaciones y resultaron en una gran variabilidad en los resultados cuando las terapias se administraban en el mismo momento para todos los ratones (en este caso, 8 semanas de edad). Por ello, de manera adicional al modelo espontáneo con el ratón TH-MYCN, se utilizó un modelo inducido en el que las células tumorales de neuroblastoma eran implantadas ortotópicamente en la glándula suprarrenal de ratones salvajes 129/SvJ^{120,275,276}. En este último modelo, las condiciones referentes a la frecuencia tumoral y tiempo de generación del tumor eran necesariamente similares en todos los ratones tratados y ratones control. La diferencia principal entre ambos modelos fue el número de dosis totales de *mCelyvir* que se administraron a los animales, ya que en el modelo inducido los animales sólo recibieron dos dosis intravenosas debido a la reducida ventana de tiempo que existe entre la cirugía, la recuperación de la misma y el tiempo que el tumor tarda en crecer. Los ratones del modelo espontáneo, los TH-MYCN, recibieron cuatro

dosis en el mismo periodo de tiempo, ya que no se sometían a una cirugía de la que tuvieran que recuperarse.

Independientemente de cuál de los dos modelos (espontáneo o inducido) se analizase, la administración sistémica de *mCelyvir* dio como resultado cambios locales en las masas tumorales relacionados con el estado inmune de los mismos. Dado que no encontramos cambios relevantes en los leucocitos circulantes en estos animales, los cambios detectados y descritos en el ambiente tumoral representaban un efecto local del tratamiento, y no generalizado. La terapia con *mCelyvir* causó un incremento del infiltrado de células inmunes por unidad de volumen tumoral si se comparaba con los ratones no tratados (controles). Dicho incremento resultaba mayor en números absolutos en el modelo espontáneo comparado con el inducido, lo que podría deberse a que la generación espontánea del tumor favorece un reclutamiento leucocitario gradual durante el desarrollo del mismo en mayor proporción a como lo puede hacer un tumor derivado de una línea tumoral que divide exponencialmente; de igual modo, los animales pertenecientes al modelo inducido recibieron cuatro dosis de *mCelyvir*, mientras que los animales del modelo espontáneo recibieron únicamente dos dosis, con lo que se podría especular que un mayor número de dosis en el modelo inducido se hubiera traducido en un mayor infiltrado leucocitario tumoral. El reclutamiento de células inmunes ya se había reportado anteriormente en la literatura cuando los virus oncolíticos son administrados directamente en las masas tumorales, y los resultados descritos en este trabajo muestran que ocurre lo mismo cuando el virus es distribuido de manera sistémica en el interior de las células. De igual modo, se pudo probar la presencia de adenovirus oncolítico en las masas tumorales en el momento del sacrificio.

La terapia también causó cambios en la calidad de los infiltrados inmunes. Se produjo un incremento de la infiltración linfoide representado por células B y células T, y este incremento era independiente del modelo murino analizado, mientras que los subtipos de células mieloides y células dendríticas se vieron afectados mayoritariamente en el modelo inducido. Otros grupos han reportado que la administración intratumoral de virus oncolíticos en ratones induce respuestas inflamatorias que implican activación de linfocitos CD4 y CD8 en las lesiones tratadas^{277–279}. En nuestro caso, también encontramos que los linfocitos CD4 y CD8 infiltrantes mostraban cambios en los marcadores asociados a activación y agotamiento tras infusiones repetidas de *mCelyvir*, lo que sugiere una activación continuada de los linfocitos T infiltrantes del tumor (TILs)²⁸⁰. Los TILs que están expresando marcadores de activación estaban más enriquecidos en número (siempre relativo al respectivo grupo control) en el modelo inducido, tanto los CD4 como los CD8; por el contrario, en el modelo espontáneo las poblaciones CD4 y CD8 mostraban enriquecimiento de los marcadores de agotamiento. Aunque no se testó la especificidad de la actividad de los TILs en este trabajo (para comprobar si ésta era antitumoral, antiadenoviral, o no específica), las diferencias inmunofenotípicas entre ambos modelos sugieren un repertorio de TILs más activos y menos exhaustos en el modelo inducido tras la

administración de *mCelyvir*, lo que podría explicar el efecto antitumoral más pronunciado apreciado en la disminución del volumen tumoral en este modelo.

En este trabajo también se analizaron los cambios relativos al microambiente tumoral, específicamente de las moléculas con un papel conocido en el equilibrio entre un ambiente protumoral y antitumoral y que modulan el crecimiento del tumor. La administración sistémica de *mCelyvir* fue seguida por cambios en el microambiente tumoral, que fueron más pronunciados en el modelo espontáneo que en el inducido (mostrado en las **Figuras 54 y 63**). Tras el tratamiento, el microambiente tumoral mostraba un perfil más inflamatorio y menos protumoral, un escenario que contribuye a crear una situación favorable para que se dé una respuesta inmune antitumoral, como ya se ha descrito anteriormente^{281,282}. Hoy en día está aceptado el papel inmunomodulador asociado a la viroterapia oncolítica derivado de mecanismos secundarios a la propia infección de las células tumorales²⁸³. En nuestra experiencia, el microambiente tumoral sufrió un cambio hacia un entorno más inflamado, evidenciado por el incremento de la expresión de citoquinas como CCL2 y CXCL10^{284,285}, y la disminución de moléculas inmunosupresoras como FoxP3, IL-10 o las arginasas^{286,287}, y moléculas que promueven el crecimiento tumoral y la invasividad, como IL-10 y TGF- β ^{288,289}.

Por lo tanto, la viroterapia oncolítica con *Celyvir* podría no solo tener un efecto lítico en las células tumorales, sino también aportar un papel inmunomodulador en el microambiente tumoral que permitiera a otras terapias administradas el poder alcanzar una respuesta clínica.

El impacto de la terapia con *mCelyvir* en cada uno de los modelos fue diferente: los cambios en la infiltración inmune y en el microambiente tumoral fueron más pronunciados en el modelo espontáneo, pero en el modelo inducido el volumen tumoral se vio reducido de manera significativa al aplicar el tratamiento. Estas diferencias en la respuesta a *mCelyvir* podrían estar relacionadas a las diferentes dosis usadas en cada modelo. En cualquier caso, aunque ambos modelos no son idénticos y hay que tomar en cuenta las diferencias entre los adenovirus oncolíticos humanos y murinos, creemos que los modelos animales descritos en esta tesis doctoral pueden ayudar a optimizar este tipo de terapias permitiendo estudiar los eventos cruciales relacionados con las respuestas inmunes que afectan tanto a la medicina como al propio tumor.

6. – CONCLUSIONES

 / **CONCLUSIONS**

Conclusiones

El trabajo desarrollado durante la presente tesis doctoral permite establecer las siguientes conclusiones:

1. Las células mesenquimales empleadas en la fabricación de *Celyvir* desempeñan un papel activo en la respuesta clínica del paciente. Esta respuesta viene determinada por la expresión de genes relacionados con procesos implicados en la interacción de las células con el adenovirus oncolítico y con el sistema inmune del paciente.
2. Las células mesenquimales optimizadas para la fabricación de *Celyvir* deben permitir la replicación del adenovirus oncolítico y no expresar genes relacionados con la respuesta antiviral innata.
3. La eliminación o disminución de la actividad de los genes MAVS y NDRG1 y el incremento de la actividad del gen de BMPR1 son estrategias de manipulación génica o farmacológica para mejorar la funcionalidad de las mesenquimales de *Celyvir*.
4. La cantidad de células inmunes intratumorales y su distribución entre diferentes subpoblaciones cambia durante el proceso de adaptación y escape tumoral al tratamiento con *Celyvir*.
5. El control inmune ejercido por *Celyvir* se asocia a un predominio de infiltrado inmune adaptativo en el tumor, mientras que el escape y progresión tumoral se asoció a un predominio de células del sistema innato.
6. El microambiente tumoral durante la progresión se asoció a un fenotipo inductor del agotamiento de los linfocitos T infiltrantes.
7. El modelo murino de *Celyvir* permite estudiar fenómenos cruciales para entender el mecanismo de acción de la terapia: biodistribución en el organismo, respuesta inmune antiadenoviral, y efectos locales en la masa tumoral, tanto a nivel de las células inmunes infiltrantes como del microambiente tumoral.

Conclusions

The work developed during this doctoral thesis has allowed us to establish the following conclusions:

1. Mesenchymal stem cells used in manufacturing *Celyvir* play an active role in the patient's clinical response. This response is determined by the expression of genes related to processes involved in the interaction of cells with the oncolytic adenovirus and the patient's immune system.
2. Optimized mesenchymal stem cells for *Celyvir* should allow replication of the oncolytic adenovirus and should not express genes related to the innate antiviral response.
3. The elimination or downregulation of MAVS and NDRG1 genes, and the upregulation of BMPRI1 gene are genetic or pharmacologic manipulation strategies to improve mesenchymal stem cells and *Celyvir* mechanism of action.
4. Intratumor immune cells amount and their distribution in different subpopulations change during treatment with *Celyvir* due to the processes of adaptation and tumor escape.
5. The immune control exerted by *Celyvir* is associated with a greater presence of adaptive immune infiltrate in the tumor, while tumor escape and tumor progression were associated to higher numbers of innate immune cells.
6. The tumor microenvironment induced T lymphocyte exhaustion during clinical progression in the presence of *Celyvir*.
7. The *Celyvir* murine model allows studying crucial phenomena to understand the mechanism of action of the therapy – biodistribution, antiadenoviral immune response, and local effects on the tumor mass –, both at the level of infiltrating immune cells and the tumor microenvironment.

7. – BIBLIOGRAFÍA

- 1 Colon NC, Chung DH. Neuroblastoma. *Adv Pediatr* 2011; **58**: 297–311.
- 2 Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet Lond Engl* 2007; **369**: 2106–2120.
- 3 Kholodenko IV, Kalinovsky DV, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res* 2018; **2018**: 7394268.
- 4 Bronner ME, Simões-Costa M. The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Curr Top Dev Biol* 2016; **116**: 115–134.
- 5 Shimada H, Chatten J, Newton WA, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T *et al*. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984; **73**: 405–416.
- 6 Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K *et al*. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 298–303.
- 7 Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D’Angio G *et al*. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1988; **6**: 1874–1881.
- 8 Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP *et al*. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1993; **11**: 1466–1477.
- 9 Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D *et al*. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncol* 2008; **9**: 247–256.
- 10 Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V *et al*. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; **18**: 500–514.
- 11 Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D *et al*. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children’s oncology group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 1007–1013.
- 12 Berlanga P, Cañete A, Castel V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2017; **22**: 63–75.
- 13 Moreno L, Caron H, Geoerger B, Eggert A, Schleiermacher G, Brock P *et al*. Accelerating drug development for neuroblastoma - New Drug Development Strategy: an Innovative Therapies for Children with Cancer, European Network for Cancer Research in Children and

Adolescents and International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma project. *Expert Opin Drug Discov* 2017; **12**: 801–811.

- 14 Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; **11**: 704–713.
- 15 Okubo T, Knoepfler PS, Eisenman RN, Hogan BLM. Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. *Dev Camb Engl* 2005; **132**: 1363–1374.
- 16 Grady EF, Schwab M, Rosenau W. Expression of N-myc and c-src during the development of fetal human brain. *Cancer Res* 1987; **47**: 2931–2936.
- 17 Ruiz-Pérez MV, Henley AB, Arsenian-Henriksson M. The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes* 2017; **8**. doi:10.3390/genes8040113.
- 18 Grimmer MR, Weiss WA. Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Curr Opin Pediatr* 2006; **18**: 634–638.
- 19 Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 203–216.
- 20 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV *et al*. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; **500**: 415–421.
- 21 Majzner RG, Heitzeneder S, Mackall CL. Harnessing the Immunotherapy Revolution for the Treatment of Childhood Cancers. *Cancer Cell* 2017; **31**: 476–485.
- 22 Katsonis P, Koire A, Wilson SJ, Hsu T-K, Lua RC, Wilkins AD *et al*. Single nucleotide variations: Biological impact and theoretical interpretation. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2014; **23**: 1650–1666.
- 23 Schrama D, Ritter C, Becker JC. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin Immunopathol* 2017; **39**: 255–268.
- 24 Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M *et al*. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; **24**: 541–550.
- 25 Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012; **125**: 5591–5596.
- 26 Lança T, Silva-Santos B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 717–725.
- 27 Feng F, Zheng G, Wang Q, Liu S, Liu Z, Xu G *et al*. Low lymphocyte count and high monocyte count predicts poor prognosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2018; **18**: 148.

- 28 Miksch RC, Schoenberg MB, Weniger M, Bösch F, Ormanns S, Mayer B *et al.* Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Neutrophils on Survival of Patients with Upfront Resection of Pancreatic Cancer. *Cancers* 2019; **11**. doi:10.3390/cancers11010039.
- 29 Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* 2019; **8**. doi:10.1080/2162402X.2019.1593806.
- 30 Ai L, Mu S, Wang Y, Wang H, Cai L, Li W *et al.* Prognostic role of myeloid-derived suppressor cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2018; **18**: 1220.
- 31 Cui TX, Kryczek I, Zhao L, Zhao E, Kuick R, Roh MH *et al.* Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity* 2013; **39**: 611–621.
- 32 Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2012; **22**: 275–281.
- 33 Mantovani Alberto, Locati Massimo. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 1478–1483.
- 34 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; **25**: 677–686.
- 35 Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018; **233**: 6425–6440.
- 36 Kuroda E, Ho V, Ruschmann J, Antignano F, Hamilton M, Rauh MJ *et al.* SHIP represses the generation of IL-3-induced M2 macrophages by inhibiting IL-4 production from basophils. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009; **183**: 3652–3660.
- 37 Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 23–35.
- 38 Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 2017; **5**: 3–8.
- 39 Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J *et al.* Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011; **30**: 83–95.
- 40 Deng J, Liu Y, Lee H, Herrmann A, Zhang W, Zhang C *et al.* S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* 2012; **21**: 642–654.

- 41 Raychaudhuri B, Rayman P, Huang P, Grabowski M, Hambardzumyan D, Finke JH *et al.* Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. *J Neurooncol* 2015; **122**: 293–301.
- 42 Eruslanov E, Neuberger M, Daurkin I, Perrin GQ, Algood C, Dahm P *et al.* Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J Cancer* 2012; **130**: 1109–1119.
- 43 Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh C-S, Lee H-M, Herndon J *et al.* Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother CII* 2012; **61**: 1373–1385.
- 44 Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S *et al.* Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013; **190**: 3783–3797.
- 45 Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology* 2015; **220**: 833–844.
- 46 Giovanelli P, Sandoval TA, Cubillos-Ruiz JR. Dendritic Cell Metabolism and Function in Tumors. *Trends Immunol* 2019; **40**: 699–718.
- 47 Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004; **172**: 464–474.
- 48 He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 215471.
- 49 Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer* 2016; **4**: 40.
- 50 Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 2017; **14**: 662–674.
- 51 Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS *et al.* Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 1159–1166.
- 52 Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; **298**: 850–854.

- 53 Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; **17**: 4550–4557.
- 54 Lee HJ, Kim Y-A, Sim CK, Heo S-H, Song IH, Park HS *et al.* Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 113345–113359.
- 55 Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2016; **4**: 59.
- 56 Markel G, Cohen-Sinai T, Besser MJ, Oved K, Itzhaki O, Seidman R *et al.* Preclinical evaluation of adoptive cell therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009; **29**: 145–154.
- 57 Santoiemma PP, Powell DJ. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; **16**: 807–820.
- 58 Mayor M, Yang N, Sterman D, Jones DR, Adusumilli PS. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current concepts and clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016; **49**: 1324–1333.
- 59 Apps JR, Hasan F, Campus O, Behjati S, Jacques TS, J Sebire N *et al.* The immune environment of paediatric solid malignancies: evidence from an immunohistochemical study of clinical cases. *Fetal Pediatr Pathol* 2013; **32**: 298–307.
- 60 Mina M, Boldrini R, Citti A, Romania P, D'Alicandro V, De Ioris M *et al.* Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncoimmunology* 2015; **4**: e1019981.
- 61 Sait S, Modak S. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017; **17**: 889–904.
- 62 Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G *et al.* Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008; **14**: 1264–1270.
- 63 Künkele A, Taraseviciute A, Finn LS, Johnson AJ, Berger C, Finney O *et al.* Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility. *Clin Cancer Res* 2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0354.
- 64 Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD *et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor–positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011; **118**: 6050–6056.

- 65 Long AH, Highfill SL, Cui Y, Smith JP, Walker AJ, Ramakrishna S *et al.* Reduction of MDSCs with All-trans Retinoic Acid Improves CAR Therapy Efficacy for Sarcomas. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**: 869–880.
- 66 Mao Y, Eissler N, Blanc KL, Johnsen JI, Kogner P, Kiessling R. Targeting Suppressive Myeloid Cells Potentiates Checkpoint Inhibitors to Control Spontaneous Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 3849–3859.
- 67 Ara T, Nakata R, Sheard MA, Shimada H, Buettner R, Groshen SG *et al.* Critical Role of STAT3 in IL-6–Mediated Drug Resistance in Human Neuroblastoma. *Cancer Res* 2013; **73**: 3852–3864.
- 68 Asgharzadeh S, Salo JA, Ji L, Oberthuer A, Fischer M, Berthold F *et al.* Clinical Significance of Tumor-Associated Inflammatory Cells in Metastatic Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 3525–3532.
- 69 Fu L-Q, Wang S-B, Cai M-H, Wang X-J, Chen J-Y, Tong X-M *et al.* Recent advances in oncolytic virus-based cancer therapy. *Virus Res* 2019; **270**: 197675.
- 70 Bluming AZ, Ziegler JL. Regression of Burkitt’s lymphoma in association with measles infection. *Lancet Lond Engl* 1971; **2**: 105–106.
- 71 Thomas JA, Badini M. The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian J Cancer* 2011; **48**: 246–251.
- 72 Perner L, Fowler GA, Nauts HC. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. *Acta Med Scand Suppl* 1958; **338**: 1–47.
- 73 Bierman HR, Crile DM, Dod KS, Kelly KH, Petrakis NL, White LP *et al.* Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* 1953; **6**: 591–605.
- 74 Sinkovics J, Horvath J. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* 1993; **36**: 193–214.
- 75 Ribacka C, Hemminki A. Virotherapy as an approach against cancer stem cells. *Curr Gene Ther* 2008; **8**: 88–96.
- 76 Cripe TP, Wang P-Y, Marcato P, Mahller YY, Lee PW. Targeting cancer-initiating cells with oncolytic viruses. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2009; **17**: 1677–1682.
- 77 Hedley SJ, Chen J, Mountz JD, Li J, Curiel DT, Korokhov N *et al.* Targeted and shielded adenovectors for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother CII* 2006; **55**: 1412–1419.
- 78 Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A *et al.* An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000; **6**: 1134–1139.

- 79 Alemany R. Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med* 2007; **28**: 42–58.
- 80 Alonso MM, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele NB, Piao Y, Yung WKA *et al.* Combination of the oncolytic adenovirus ICOVIR-5 with chemotherapy provides enhanced anti-glioma effect in vivo. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 756–761.
- 81 Friedman GK, Pressey JG, Reddy AT, Markert JM, Gillespie GY. Herpes simplex virus oncolytic therapy for pediatric malignancies. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2009; **17**: 1125–1135.
- 82 Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 2018; **14**: 839–846.
- 83 Perez MC, Miura JT, Naqvi SMH, Kim Y, Holstein A, Lee D *et al.* Talimogene Laherparepvec (TVEC) for the Treatment of Advanced Melanoma: A Single-Institution Experience. *Ann Surg Oncol* 2018; **25**: 3960–3965.
- 84 Ressler J, Silmbrod R, Stepan A, Tuchmann F, Cicha A, Uyanik-Ünal K *et al.* Talimogene laherparepvec (T-VEC) in advanced melanoma: complete response in a heart and kidney transplant patient. A case report. *Br J Dermatol* 2019; **181**: 186–189.
- 85 Yang WQ, Senger D, Muzik H, Shi ZQ, Johnson D, Brasher PMA *et al.* Reovirus prolongs survival and reduces the frequency of spinal and leptomeningeal metastases from medulloblastoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 3162–3172.
- 86 Hingorani P, Zhang W, Lin J, Liu L, Guha C, Kolb EA. Systemic administration of reovirus (Reolysin) inhibits growth of human sarcoma xenografts. *Cancer* 2011; **117**: 1764–1774.
- 87 McCart JA, Ward JM, Lee J, Hu Y, Alexander HR, Libutti SK *et al.* Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* 2001; **61**: 8751–8757.
- 88 Friedman GK, Cassady KA, Beierle EA, Markert JM, Gillespie GY. Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res* 2012; **71**: 500–510.
- 89 Liu T-C, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; **4**: 101–117.
- 90 Search of: oncolytic virus | First posted on or before 12/31/2017 - List Results - ClinicalTrials.gov.
https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=oncolytic+virus&type=&rslt=&age_v=&gndr=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&cntry=&state=&city=&dist=&locn=&strd_s=&strd_e=&prcd_s=&prcd_e=&sfpd_s=&sfpd_e=12%2F31%2F2017&lupd_s=&lupd_e=&sort= (accessed 6 Sep2019).
- 91 Warner SG, O’Leary MP, Fong Y. Therapeutic oncolytic viruses: clinical advances and future directions. *Curr Opin Oncol* 2017; **29**: 359–365.

- 92 Search of: oncolytic virus | First posted on or before 08/31/2019 - List Results - ClinicalTrials.gov.
https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=oncolytic+virus&type=&rslt=&age_v=&gndr=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&cntry=&state=&city=&dist=&locn=&strd_s=&strd_e=&prcd_s=&prcd_e=&sfpd_s=&sfpd_e=08%2F31%2F2019&lupd_s=&lupd_e=&sort= (accessed 6 Sep2019).
- 93 Marelli G, Howells A, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.00866.
- 94 Cattaneo R, Russell SJ. How to develop viruses into anticancer weapons. *PLoS Pathog* 2017; **13**. doi:10.1371/journal.ppat.1006190.
- 95 Lv P, Liu X, Chen X, Liu C, Zhang Y, Chu C *et al*. Genetically Engineered Cell Membrane Nanovesicles for Oncolytic Adenovirus Delivery: A Versatile Platform for Cancer Virotherapy. *Nano Lett* 2019; **19**: 2993–3001.
- 96 Garofalo M, Villa A, Rizzi N, Kuryk L, Mazzaferro V, Ciana P. Systemic Administration and Targeted Delivery of Immunogenic Oncolytic Adenovirus Encapsulated in Extracellular Vesicles for Cancer Therapies. *Viruses* 2018; **10**. doi:10.3390/v10100558.
- 97 Garofalo M, Saari H, Somersalo P, Crescenti D, Kuryk L, Aksela L *et al*. Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2018; **283**: 223–234.
- 98 Aoyama K, Kuroda S, Morihiro T, Kanaya N, Kubota T, Kakiuchi Y *et al*. Liposome-encapsulated plasmid DNA of telomerase-specific oncolytic adenovirus with stealth effect on the immune system. *Sci Rep* 2017; **7**: 14177.
- 99 Parker Kerrigan BC, Shimizu Y, Andreeff M, Lang FF. Mesenchymal stromal cells for the delivery of oncolytic viruses in gliomas. *Cytotherapy* 2017; **19**: 445–457.
- 100 Muhammad T, Sakhawat A, Khan AA, Ma L, Gjerset RA, Huang Y. Mesenchymal stem cell-mediated delivery of therapeutic adenoviral vectors to prostate cancer. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 190.
- 101 Kaczorowski A, Hammer K, Liu L, Villhauer S, Nwaeburu C, Fan P *et al*. Delivery of improved oncolytic adenoviruses by mesenchymal stromal cells for elimination of tumorigenic pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2016; **7**: 9046–9059.
- 102 Li Z, Ye Z, Zhang X, Zhang Q, Fan D, Zhang Y *et al*. E1A-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cells as carriers and amplifiers for adenovirus suppress hepatocarcinoma in mice. *Oncotarget* 2016; **7**: 51815–51828.

- 103 Mooney R, Majid AA, Batalla-Covello J, Machado D, Liu X, Gonzaga J *et al.* Enhanced Delivery of Oncolytic Adenovirus by Neural Stem Cells for Treatment of Metastatic Ovarian Cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2019; **12**: 79–92.
- 104 VanSeggelen H, Tantaló DG, Afsahi A, Hammill JA, Bramson JL. Chimeric antigen receptor–engineered T cells as oncolytic virus carriers. *Mol Ther Oncolytics* 2015; **2**: 15014.
- 105 Bunuales M, García-Aragoncillo E, Casado R, Quetglas JJ, Hervás-Stubbs S, Bortolanza S *et al.* Evaluation of monocytes as carriers for armed oncolytic adenoviruses in murine and Syrian hamster models of cancer. *Hum Gene Ther* 2012; **23**: 1258–1268.
- 106 Li Z-L, Liang X, Li H-C, Wang Z-M, Chong T. Dendritic cells serve as a ‘Trojan horse’ for oncolytic adenovirus delivery in the treatment of mouse prostate cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2016; **37**: 1121–1128.
- 107 Ran L, Tan X, Li Y, Zhang H, Ma R, Ji T *et al.* Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy. *Biomaterials* 2016; **89**: 56–66.
- 108 Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Pérez-Giménez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity–efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2007; **15**: 1607–1615.
- 109 Alonso MM, Cascallo M, Gómez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Pérez-Giménez A *et al.* ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. *Cancer Res* 2007; **67**: 8255–8263.
- 110 Lourenco S, Teixeira VH, Kalber T, Jose RJ, Floto RA, Janes SM. Macrophage Migration Inhibitory Factor–CXCR4 Is the Dominant Chemotactic Axis in Human Mesenchymal Stem Cell Recruitment to Tumors. *J Immunol* 2015; **194**: 3463–3474.
- 111 Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008; **15**: 730–738.
- 112 Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013; **2013**: 130763.
- 113 Becker AD, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* 2016; **8**: 73–87.
- 114 Melen GJ, Franco-Luzón L, Ruano D, González-Murillo Á, Alfranca A, Casco F *et al.* Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett* 2016; **371**: 161–170.

- 115 Poggi A, Zocchi MR. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: Still Unresolved 'Yin and Yang'. *Curr Stem Cell Res Ther* 2019; **14**: 344–350.
- 116 Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 2018. doi:10.1155/2018/3057624.
- 117 García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, Martínez-Quintanilla J, Arriero M del M, Lassaletta A *et al.* Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther* 2010; **17**: 476–483.
- 118 Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 1997; **16**: 2985–2995.
- 119 Rasmuson A, Segerström L, Nethander M, Finnman J, Elfman LHM, Javanmardi N *et al.* Tumor development, growth characteristics and spectrum of genetic aberrations in the TH-MYCN mouse model of neuroblastoma. *PloS One* 2012; **7**: e51297.
- 120 Kroesen M, Brok IC, Reijnen D, van Hout-Kuijer MA, Zeelenberg IS, Den Brok MH *et al.* Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents. *Cancer Immunol Immunother CII* 2015; **64**: 563–572.
- 121 Kroesen M, Nierkens S, Ansems M, Wassink M, Orentas RJ, Boon L *et al.* A transplantable TH-MYCN transgenic tumor model in C57Bl/6 mice for preclinical immunological studies in neuroblastoma. *Int J Cancer* 2014; **134**: 1335–1345.
- 122 Prigione I, Corrias MV, Airoidi I, Raffaghello L, Morandi F, Bocca P *et al.* Immunogenicity of Human Neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1028**: 69–80.
- 123 Carlson L-M, Rasmuson A, Idborg H, Segerström L, Jakobsson P-J, Sveinbjörnsson B *et al.* Low-dose aspirin delays an inflammatory tumor progression in vivo in a transgenic mouse model of neuroblastoma. *Carcinogenesis* 2013; **34**: 1081–1088.
- 124 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; **454**: 436–444.
- 125 DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 309–316.
- 126 Blair GE, Dixon SC, Griffiths SA, Zajdel ME. Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Res* 1989; **14**: 339–346.
- 127 Azab W, Dayaram A, Greenwood AD, Osterrieder N. How Host Specific Are Herpesviruses? Lessons from Herpesviruses Infecting Wild and Endangered Mammals. *Annu Rev Virol* 2018; **5**: 53–68.

- 128 Smith K, Ying B, Ball AO, Beard CW, Spindler KR. Interaction of mouse adenovirus type 1 early region 1A protein with cellular proteins pRb and p107. *Virology* 1996; **224**: 184–197.
- 129 Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA *et al.* Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; **334**: 124–129.
- 130 Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J, Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 1979; **17**: 935–944.
- 131 Jones N, Shenk T. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 3665–3669.
- 132 Lillie JW, Loewenstein PM, Green MR, Green M. Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell* 1987; **50**: 1091–1100.
- 133 Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Transl* 2015; **3**: 26–33.
- 134 Zhang B, Zhang B, Zhang J, Zhang J, Shi H, Shi H *et al.* A novel method to isolate mesenchymal stem cells from mouse umbilical cord. *Mol Med Rep* 2018; **17**: 861–869.
- 135 Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 2004; **117**: 5655–5664.
- 136 Mabuchi Y, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective Isolation of Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Based on Surface Markers. *Stem Cells Int.* 2013. doi:10.1155/2013/507301.
- 137 Caroti CM, Ahn H, Salazar HF, Joseph G, Sankar SB, Willett NJ *et al.* A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained Multipotency. *Sci Rep* 2017; **7**. doi:10.1038/s41598-017-13477-y.
- 138 Hu Y, Lou B, Wu X, Wu R, Wang H, Gao L *et al.* Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018. doi:10.1155/2018/6704583.
- 139 Banerjee SA, Hoppe P, Brilliant M, Chikaraishi DM. 5' flanking sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene target accurate tissue-specific, developmental, and transsynaptic expression in transgenic mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1992; **12**: 4460–4467.
- 140 Haraguchi S, Nakagawara A. A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PloS One* 2009; **4**: e6902.
- 141 Ying B, Smith K, Spindler KR. Mouse Adenovirus Type 1 Early Region 1A Is Dispensable for Growth in Cultured Fibroblasts. *J Virol* 1998; **72**: 6325–6331.

- 142 Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, Vegesna R, Kim H, Torres-Garcia W *et al.* Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun* 2013; **4**: 2612.
- 143 Ramírez M, García-Castro J, Melen GJ, González-Murillo Á, Franco-Luzón L. Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology. *Oncolytic Virotherapy* 2015; **4**: 149–155.
- 144 Harrington K, Freeman DJ, Kelly B, Harper J, Soria J-C. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2019. doi:10.1038/s41573-019-0029-0.
- 145 Sivanandam V, LaRocca CJ, Chen NG, Fong Y, Warner SG. Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibition: The Best of Both Worlds. *Mol Ther Oncolytics* 2019; **13**: 93–106.
- 146 Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Price R, Wojton J, Pradarelli J, Mao H *et al.* NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. *Nat Med* 2012; **18**: 1827–1834.
- 147 Altomonte J, Wu L, Meseck M, Chen L, Ebert O, Garcia-Sastre A *et al.* Enhanced oncolytic potency of vesicular stomatitis virus through vector-mediated inhibition of NK and NKT cells. *Cancer Gene Ther* 2009; **16**: 266–278.
- 148 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Adaptive Immune System. *Mol Biol Cell 4th Ed* 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/> (accessed 30 Jul2019).
- 149 Jager D, Jager E, Knuth A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol* 2001; **54**: 669–674.
- 150 Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 135–146.
- 151 Ramirez M, Ruano D, Moreno L, Lassaletta Á, Sirvent FJB, Andi6n M *et al.* First-in-child trial of celyvir (autologous mesenchymal stem cells carrying the oncolytic virus ICOVIR-5) in patients with relapsed and refractory pediatric solid tumors. *J Clin Oncol* 2018; **36**: 10543–10543.
- 152 Hoogduijn MJ. Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Res Ther* 2015; **17**: 88.
- 153 Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A *et al.* Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 2011; **108**: 17384–17389.
- 154 Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM *et al.* Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 2006; **107**: 4817–4824.

- 155 Chan JL, Harrison JS, Ponzio NM, Rameshwar P. Mesenchymal Stem Cells (MSC) Exhibit Antigen Presenting (APC) and Phagocytic Properties: Implications to Bone Marrow Failure during Inflammation. *Blood* 2004; **104**: 4249–4249.
- 156 Sheng W, Feng Z, Song Q, Niu H, Miao G. Modulation of mesenchymal stem cells with miR-375 to improve their therapeutic outcome during scar formation. *Am J Transl Res* 2016; **8**: 2079–2087.
- 157 Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY, Tkachuk VA *et al.* Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med* 2013; **11**: 138.
- 158 Saeidi A, Zandi K, Cheok YY, Saeidi H, Wong WF, Lee CYQ *et al.* T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.02569.
- 159 Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* 2015; **479–480**: 180–193.
- 160 May JE, Donaldson C, Gynn L, Morse HR. Chemotherapy-induced genotoxic damage to bone marrow cells: long-term implications. *Mutagenesis* 2018; **33**: 241–251.
- 161 Gencheva M, Hare I, Kurian S, Fortney J, Piktel D, Wysolmerski R *et al.* Bone marrow osteoblast vulnerability to chemotherapy. *Eur J Haematol* 2013; **90**: 469–478.
- 162 Agool A, Slart RHJA, Thorp KK, Glaudemans AWJM, Cobben DCP, Been LB *et al.* Effect of radiotherapy and chemotherapy on bone marrow activity: a 18F-FLT-PET study. *Nucl Med Commun* 2011; **32**: 17–22.
- 163 López M, Ruiz Romero G, Vega García M, Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica, Genoma España. *Biología de sistemas: informe de vigilancia tecnológica*. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica: Madrid, 2007.
- 164 Anaxomics Biotech SL - Systems Biology Solutions. <http://www.anaxomics.com/> (accessed 7 Aug 2019).
- 165 Lemancewicz D, Dziecioł J, Kłoczko J, Piszcz J. The influence of chemotherapy on bone marrow in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Folia Morphol* 2004; **63**: 485–489.
- 166 Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; **141**: 1985–1994.
- 167 Fang BA, Kovačević Ž, Park KC, Kalinowski DS, Jansson PJ, Lane DJR *et al.* Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a

- molecular target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2014; **1845**: 1–19.
- 168 Park KC, Menezes SV, Kalinowski DS, Sahni S, Jansson PJ, Kovacevic Z *et al.* Identification of differential phosphorylation and sub-cellular localization of the metastasis suppressor, NDRG1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; **1864**: 2644–2663.
 - 169 Chen L, Xing C, Ma G, Luo J, Su W, Li M *et al.* N-myc downstream-regulated gene 1 facilitates influenza A virus replication by suppressing canonical NF- κ B signaling. *Virus Res* 2018; **252**: 22–28.
 - 170 Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* 2005; **122**: 669–682.
 - 171 Zamorano Cuervo N, Osseman Q, Grandvaux N. Virus Infection Triggers MAVS Polymers of Distinct Molecular Weight. *Viruses* 2018; **10**. doi:10.3390/v10020056.
 - 172 Vazquez C, Horner SM. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J Virol* 2015; **89**: 6974–6977.
 - 173 Bhoj VG, Sun Q, Bhoj EJ, Somers C, Chen X, Torres J-P *et al.* MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci* 2008; **105**: 14046–14051.
 - 174 Deng J, Chen Y, Liu G, Ren J, Go C, Ivanciuc T *et al.* Mitochondrial antiviral-signalling protein plays an essential role in host immunity against human metapneumovirus. *J Gen Virol* 2015; **96**: 2104–2113.
 - 175 Haist KC, Burrack KS, Davenport BJ, Morrison TE. Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLoS Pathog* 2017; **13**: e1006748.
 - 176 Knolle PA. Hitting the right button: MAVS-mediated defense against HAV infection. *Cell Res* 2017; **27**: 7–8.
 - 177 Dutta M, Robertson SJ, Okumura A, Scott DP, Chang J, Weiss JM *et al.* A Systems Approach Reveals MAVS Signaling in Myeloid Cells as Critical for Resistance to Ebola Virus in Murine Models of Infection. *Cell Rep* 2017; **18**: 816–829.
 - 178 Li X-D, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 17717–17722.
 - 179 Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**: 878–888.

- 180 Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N *et al.* Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001; **14**: 705–714.
- 181 Lehmann MH, Torres-Domínguez LE, Price PJR, Brandmüller C, Kirschning CJ, Sutter G. CCL2 expression is mediated by type I IFN receptor and recruits NK and T cells to the lung during MVA infection. *J Leukoc Biol* 2016; **99**: 1057–1064.
- 182 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; **29**: 313–326.
- 183 Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto Á, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A *et al.* CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *J Immunol* 2014; **192**: 3858–3867.
- 184 Xie Z, Tang S, Ye G, Wang P, Li J, Liu W *et al.* Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018; **9**: 13.
- 185 Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b⁺ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem* 2009; **284**: 34342–34354.
- 186 Li L, Liu Y-D, Zhan Y-T, Zhu Y-H, Li Y, Xie D *et al.* High levels of CCL2 or CCL4 in the tumor microenvironment predict unfavorable survival in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer* 2018; **9**: 775–784.
- 187 Chang AL, Miska J, Wainwright DA, Dey M, Rivetta CV, Yu D *et al.* CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 2016; **76**: 5671–5682.
- 188 Jiang C, Lin X. Regulation of NF- κ B by the CARD proteins. *Immunol Rev* 2012; **246**: 141–153.
- 189 Sun Q, Sun L, Liu H-H, Chen X, Seth RB, Forman J *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 2006; **24**: 633–642.
- 190 Di Fiore IJM, Holloway G, Coulson BS. Innate immune responses to rotavirus infection in macrophages depend on MAVS but involve neither the NLRP3 inflammasome nor JNK and p38 signaling pathways. *Virus Res* 2015; **208**: 89–97.
- 191 Roe K, Giordano D, Young LB, Draves KE, Holder U, Suthar MS *et al.* Dendritic cell-associated MAVS is required to control West Nile virus replication and ensuing humoral immune responses. *PloS One* 2019; **14**: e0218928.
- 192 Demirhan O, Türkmen S, Schwabe GC, Soyupak S, Akgül E, Taştemiz D *et al.* A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J Med Genet* 2005; **42**: 314–317.

- 193 Racacho L, Byrnes AM, MacDonald H, Dranse HJ, Nikkel SM, Allanson J *et al.* Two novel disease-causing variants in BMPR1B are associated with brachydactyly type A1. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**: 1640–1645.
- 194 Yan W, Zheng C, He J, Zhang W, Huang X-A, Li X *et al.* Eleutheroside B1 mediates its anti-influenza activity through POLR2A and N-glycosylation. *Int J Mol Med* 2018; **42**: 2776–2792.
- 195 König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann H-H, Bhattacharyya S *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 2010; **463**: 813–817.
- 196 Capitanio JS, Wozniak RW. Host Cell Factors Necessary for Influenza A Infection: Meta-Analysis of Genome Wide Studies. 2012; : 23.
- 197 Stichling N, Suomalainen M, Flatt JW, Schmid M, Pacesa M, Hemmi S *et al.* Lung macrophage scavenger receptor SR-A6 (MARCO) is an adenovirus type-specific virus entry receptor. *PLoS Pathog* 2018; **14**: e1006914.
- 198 Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology* 2015; **479–480**: 131–145.
- 199 Stavrou S, Ross SR. APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2015; **195**: 4565–4570.
- 200 Willems L, Gillet NA. APOBEC3 Interference during Replication of Viral Genomes. *Viruses* 2015; **7**: 2999–3018.
- 201 Moris A, Murray S, Cardinaud S. AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front Microbiol* 2014; **5**. doi:10.3389/fmicb.2014.00534.
- 202 Lee J, Ghonime MG, Wang R, Cassady KA. The Antiviral Apparatus: STING and Oncolytic Virus Restriction. *Mol Ther - Oncolytics* 2019; **13**: 7–13.
- 203 Li A, Yi M, Qin S, Song Y, Chu Q, Wu K. Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol Hematol Oncol* 2019; **12**. doi:10.1186/s13045-019-0721-x.
- 204 Veal E, Eisenstein M, Tseng ZH, Gill G. A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5032–5041.
- 205 Sacher M, Di Bacco A, Lunin VV, Ye Z, Wagner J, Gill G *et al.* The crystal structure of CREG, a secreted glycoprotein involved in cellular growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 18326–18331.
- 206 Ghobrial G, Araujo L, Jinwala F, Li S, Lee LY. The Structure and Biological Function of CREG. *Front Cell Dev Biol* 2018; **6**: 136.

- 207 Veal E, Groisman R, Eisenstein M, Gill G. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 2000; **19**: 2120–2128.
- 208 Rosner K, Kasprzak MF, Horenstein ACJ, Thurston HL, Abrams J, Kerwin LY *et al.* Engineering a waste management enzyme to overcome cancer resistance to apoptosis: adding DNase1 to the anti-cancer toolbox. *Cancer Gene Ther* 2011; **18**: 346–357.
- 209 Malecki M, Dahlke J, Haig M, Wohlwend L, Malecki R. Eradication of Human Ovarian Cancer Cells by Transgenic Expression of Recombinant DNASE1, DNASE1L3, DNASE2, and DFFB Controlled by EGFR Promoter: Novel Strategy for Targeted Therapy of Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013; **4**: 152.
- 210 Oklu R, Sheth RA, Wong KHK, Jahromi AH, Albadawi H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2017; **7**: S140–S149.
- 211 Lavrov AV, Chelysheva EY, Smirnikhina SA, Shukhov OA, Turkina AG, Adilgereeva EP *et al.* Frequent variations in cancer-related genes may play prognostic role in treatment of patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Genet* 2016; **17 Suppl 1**: 14.
- 212 Miles RR, Crockett DK, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Analysis of BCL6-interacting proteins by tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics MCP* 2005; **4**: 1898–1909.
- 213 Ummanni R, Jost E, Braig M, Lohmann F, Mundt F, Barett C *et al.* Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Mol Cancer* 2011; **10**: 129.
- 214 Finnerty BM, Moore M, Verma A, Aronova A, Huang S, Edwards DP *et al.* UCHL1 loss alters the cell-cycle in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2019; **26**: 411–423.
- 215 Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H *et al.* Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull* 2008; **31**: 1071–1074.
- 216 Gu Y, Lv F, Xue M, Chen K, Cheng C, Ding X *et al.* The deubiquitinating enzyme UCHL1 is a favorable prognostic marker in neuroblastoma as it promotes neuronal differentiation. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2018; **37**: 258.
- 217 Sanchez-Diaz PC, Chang JC, Moses ES, Dao T, Chen Y, Hung JY. Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) is associated with stem-like cancer cell functions in pediatric high-grade glioma. *PLoS One* 2017; **12**: e0176879.
- 218 Chai G, Zhou L, Manto M, Helmbacher F, Clotman F, Goffinet AM *et al.* Celsr3 is required in motor neurons to steer their axons in the hindlimb. *Nat Neurosci* 2014; **17**: 1171–1179.

- 219 Wang X-J, Zhang D-L, Xu Z-G, Ma M-L, Wang W-B, Li L-L *et al.* Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors. *J Neurochem* 2014; **131**: 699–711.
- 220 Fan S, Tang J, Li N, Zhao Y, Ai R, Zhang K *et al.* Integrative analysis with expanded DNA methylation data reveals common key regulators and pathways in cancers. *NPJ Genomic Med* 2019; **4**: 2.
- 221 Yin X, Krikorian P, Logan T, Csizmadia V. Induction of RIP-2 kinase by proinflammatory cytokines is mediated via NF-kappaB signaling pathways and involves a novel feed-forward regulatory mechanism. *Mol Cell Biochem* 2010; **333**: 251–259.
- 222 Canning P, Ruan Q, Schwerd T, Hrdinka M, Maki JL, Saleh D *et al.* Inflammatory Signaling by NOD-RIPK2 Is Inhibited by Clinically Relevant Type II Kinase Inhibitors. *Chem Biol* 2015; **22**: 1174–1184.
- 223 Tigno-Aranjuez JT, Asara JM, Abbott DW. Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses. *Genes Dev* 2010; **24**: 2666–2677.
- 224 Tigno-Aranjuez JT, Benderitter P, Rombouts F, Deroose F, Bai X, Mattioli B *et al.* In vivo inhibition of RIPK2 kinase alleviates inflammatory disease. *J Biol Chem* 2014; **289**: 29651–29664.
- 225 Zou PF, Chang MX, Li Y, Xue NN, Li JH, Chen SN *et al.* NOD2 in zebrafish functions in antibacterial and also antiviral responses via NF- κ B, and also MDA5, RIG-I and MAVS. *Fish Shellfish Immunol* 2016; **55**: 173–185.
- 226 Weissbach L, Settleman J, Kalady MF, Snijders AJ, Murthy AE, Yan YX *et al.* Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20517–20521.
- 227 Watanabe T, Wang S, Kaibuchi K. IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Struct Funct* 2015; **40**: 69–77.
- 228 Wu C-C, Li H, Xiao Y, Yang L-L, Chen L, Deng W-W *et al.* Over-expression of IQGAP1 indicates poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Mol Histol* 2018; **49**: 389–398.
- 229 Zeng F, Jiang W, Zhao W, Fan Y, Zhu Y, Zhang H. Ras GTPase-Activating-Like Protein IQGAP1 (IQGAP1) Promotes Breast Cancer Proliferation and Invasion and Correlates with Poor Clinical Outcomes. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2018; **24**: 3315–3323.
- 230 Reimer M, Denby E, Zustiak SP, Schober JM. Ras GAP-related and C-terminal domain-dependent localization and tumorigenic activities of IQGAP1 in melanoma cells. *PloS One* 2017; **12**: e0189589.
- 231 Li Z, McNulty DE, Marler KJM, Lim L, Hall C, Annan RS *et al.* IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13871–13878.

- 232 Liu CX, Musco S, Lisitsina NM, Yaklichkin SY, Lisitsyn NA. Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B. *Genomics* 2000; **69**: 271–274.
- 233 Liu CX, Li Y, Obermoeller-McCormick LM, Schwartz AL, Bu G. The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 28889–28896.
- 234 Wang Z, Sun P, Gao C, Chen J, Li J, Chen Z *et al.* Down-regulation of LRP1B in colon cancer promoted the growth and migration of cancer cells. *Exp Cell Res* 2017; **357**: 1–8.
- 235 Lan S, Li H, Liu Y, Ma L, Liu X, Liu Y *et al.* Somatic mutation of LRP1B is associated with tumor mutational burden in patients with lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth* 2019; **132**: 154–156.
- 236 Chen H, Chong W, Wu Q, Yao Y, Mao M, Wang X. Corrigendum: Association of LRP1B Mutation With Tumor Mutation Burden and Outcomes in Melanoma and Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated With Immune Check-Point Blockades. *Front Immunol* 2019; **10**: 1523.
- 237 Lehen'kyi V, Raphaël M, Prevarskaya N. The role of the TRPV6 channel in cancer. *J Physiol* 2012; **590**: 1369–1376.
- 238 Fels B, Bulk E, Pethő Z, Schwab A. The Role of TRP Channels in the Metastatic Cascade. *Pharm Basel Switz* 2018; **11**. doi:10.3390/ph11020048.
- 239 Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD *et al.* TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium* 2013; **54**: 404–415.
- 240 Hussain MRM, Hoessli DC, Fang M. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 54067–54081.
- 241 Boiko N, Kucher V, Wang B, Stockand JD. Restrictive expression of acid-sensing ion channel 5 (ASIC5) in unipolar brush cells of the vestibulocerebellum. *PLoS One* 2014; **9**: e91326.
- 242 Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D *et al.* Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2016; **57**: 39–49.
- 243 Guin S, Ru Y, Agarwal N, Lew CR, Owens C, Comi GP *et al.* Loss of Glycogen Debranching Enzyme AGL Drives Bladder Tumor Growth via Induction of Hyaluronic Acid Synthesis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; **22**: 1274–1283.
- 244 Richmond CS, Oldenburg D, Dancik G, Meier DR, Weinhaus B, Theodorescu D *et al.* Glycogen debranching enzyme (AGL) is a novel regulator of non-small cell lung cancer growth. *Oncotarget* 2018; **9**: 16718–16730.

- 245 Zhu J, Ding H, Wang X, Lu Q. PABPC1 exerts carcinogenesis in gastric carcinoma by targeting miR-34c. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**: 3794–3802.
- 246 Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol* 2019; **37**: 173–200.
- 247 Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; **348**: 69–74.
- 248 Smith CC, Selitsky SR, Chai S, Armistead PM, Vincent BG, Serody JS. Alternative tumour-specific antigens. *Nat Rev Cancer* 2019; **19**: 465–478.
- 249 Seliger B, Kloor M, Ferrone S. HLA class II antigen-processing pathway in tumors: Molecular defects and clinical relevance. *Oncoimmunology* 2017; **6**. doi:10.1080/2162402X.2016.1171447.
- 250 Research AA for C. HLA Loss Facilitates Immune Escape. *Cancer Discov* 2018; **8**: 8–8.
- 251 Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M *et al*. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; **24**: 541–550.
- 252 Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhiredy D, Martins MM *et al*. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017; **168**: 487–502.e15.
- 253 Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol* 2019; **234**: 8509–8521.
- 254 Henao-Tamayo M, Irwin SM, Shang S, Ordway D, Orme IM. T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. *Tuberc Edinb Scotl* 2011; **91**: 308–313.
- 255 Ferris RL, Lu B, Kane LP. Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014; **193**: 1525–1530.
- 256 Catakovic K, Klieser E, Neureiter D, Geisberger R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal CCS* 2017; **15**. doi:10.1186/s12964-016-0160-z.
- 257 Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H *et al*. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 2018; **48**: 812–830.e14.
- 258 Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, Ali N, Dodev T, Saul L *et al*. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest* 2013; **123**: 1457–1474.
- 259 Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985; **314**: 537.

- 260 LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; **112**: 1570–1580.
- 261 Ron Y, Sprent J. T cell priming in vivo: a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950* 1987; **138**: 2848–2856.
- 262 Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; **56**: 77–83.
- 263 Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 2005; **238**: 67–75.
- 264 Alt FW, Honjo T, Radbruch A, Reth M (eds.). Chapter 14 - B Cell Memory and Plasma Cell Development. In: *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*. Academic Press: London, 2015, pp 227–249.
- 265 Tsou P, Katayama H, Ostrin EJ, Hanash SM. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Res* 2016; **76**: 5597–5601.
- 266 Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* 2016; **2**: 747–757.
- 267 Linnebacher M, Maletzki C. Tumor-infiltrating B cells. *OncolImmunology* 2012; **1**: 1186–1188.
- 268 Gupta P, Chen C, Chaluvaly-Raghavan P, Pradeep S. B Cells as an Immune-Regulatory Signature in Ovarian Cancer. *Cancers* 2019; **11**. doi:10.3390/cancers11070894.
- 269 Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011; **21**: 245–255.
- 270 Barbash Israel M., Chouraqui Pierre, Baron Jack, Feinberg Micha S., Etzion Sharon, Tessone Ariel *et al.* Systemic Delivery of Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium. *Circulation* 2003; **108**: 863–868.
- 271 Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI *et al.* Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells Dev* 2008; **18**: 683–692.
- 272 Assis ACM, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RLB, Castanheira P, Diniz SOF *et al.* Time-Dependent Migration of Systemically Delivered Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Heart. *Cell Transplant* 2010; **19**: 219–230.
- 273 Shi X-L, Gu J-Y, Han B, Xu H-Y, Fang L, Ding Y-T. Magnetically labeled mesenchymal stem cells after autologous transplantation into acutely injured liver. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 3674–3679.

- 274 Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; **101**: 2999–3001.
- 275 Cardoso CC, Bornstein SR, Hornsby PJ. Optimizing orthotopic cell transplantation in the mouse adrenal gland. *Cell Transplant* 2010; **19**: 565–572.
- 276 Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC *et al.* [Establishment of a preclinical neuroblastoma model in immunocompetent mice]. *Cirugia Pediatr Organo Of Soc Espanola Cirugia Pediatr* 2016; **29**: 66–71.
- 277 Tähtinen S, Grönberg-Vähä-Koskela S, Lumen D, Merisalo-Soikkeli M, Siurala M, Airaksinen AJ *et al.* Adenovirus Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy by Recruiting Immune Cells to and Promoting Their Activity at the Tumor. *Cancer Immunol Res* 2015; **3**: 915–925.
- 278 Tuve S, Liu Y, Tragoolpua K, Jacobs JD, Yumul RC, Li Z-Y *et al.* In situ adenovirus vaccination engages T effector cells against cancer. *Vaccine* 2009; **27**: 4225–4239.
- 279 Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, Park JS, Mansour M, Palese P *et al.* Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 226ra32.
- 280 Lee S-W, Park Y, Song A, Cheroutre H, Kwon BS, Croft M. Functional dichotomy between OX40 and 4-1BB in modulating effector CD8 T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006; **177**: 4464–4472.
- 281 Locy H, de Mey S, de Mey W, De Ridder M, Thielemans K, Maenhout SK. Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend. *Front Immunol* 2018; **9**: 2909.
- 282 Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O *et al.* Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* 2018; **174**: 1031–1032.
- 283 Achard C, Surendran A, Wedge M-E, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* 2018; **31**: 17–24.
- 284 Layer JP, Kronmüller MT, Quast T, van den Boorn-Konijnenberg D, Efferen M, Hinze D *et al.* Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *Oncoimmunology* 2017; **6**: e1320626.
- 285 Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**: 559–572.

- 286 Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol* 2013; **25**: 637–645.
- 287 Miret JJ, Kirschmeier P, Koyama S, Zhu M, Li YY, Naito Y *et al*. Suppression of Myeloid Cell Arginase Activity leads to Therapeutic Response in a NSCLC Mouse Model by Activating Anti-Tumor Immunity. *J Immunother Cancer* 2019; **7**: 32.
- 288 Shao J-B, Gao Z-M, Huang W-Y, Lu Z-B. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 2017; **50**: 1623–1633.
- 289 Zhen Z, Guo X, Liao R, Yang K, Ye L, You Z. Involvement of IL-10 and TGF- β in HLA-E-mediated neuroblastoma migration and invasion. *Oncotarget* 2016; **7**: 44340–44349.
- 290 González-Pérez A, López-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet* 2011; **88**: 440–449.
- 291 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 15545–15550.
- 292 Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J *et al*. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; **34**: 267.
- 293 Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y *et al*. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015; **12**: 453–457.



ANEXOS

Anexo 1 – Generación del secretoma de *Celyvir*.

Las MSCs de la primera cohorte de pacientes se descongelaron y se sembraron en condiciones de esterilidad, como ya se ha indicado anteriormente en este trabajo. Posteriormente, las MSCs se expandieron en número hasta que la densidad celular permitía fabricar el producto *Celyvir*. Las MSCs entonces se tripsinizaron y se llevaron a irradiar a una intensidad de 30 Gy. Posteriormente las MSCs se infectaron con ICOVIR-5 durante 2 horas y se volvieron a poner en cultivo durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se tomaron los dos elementos principales del cultivo por separado para realizar dos técnicas distintas: por un lado, el sobrenadante del cultivo celular para realizar el análisis de las proteínas excretadas por las células al medio a las 24 horas tras la infección; y por otro, la propia fracción celular para analizar el transcriptoma completo de cada uno de los pacientes (detallado en el apartado siguiente).

El análisis del sobrenadante del cultivo y el estudio del proteasoma se encargaron a la empresa Tebu-Bio, a los que se enviaron una muestra de los ocho sobrenadantes generados más una muestra del medio de cultivo estándar como control. Para obtener el sobrenadante, se siguieron las indicaciones de la empresa. Se recogió el sobrenadante obtenido del cultivo celular y se traspasó a un tubo Falcon. El sobrenadante se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. Posteriormente el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 1 mL de volumen en tubos eppendorf y se mantuvo a -80°C hasta el momento de su envío. En Tebu-Bio se ocuparon de realizar el estudio de arrays de proteínas utilizando sus kits comerciales L-507 y L-493, que, combinados, permiten el análisis de más de 1000 proteínas preseleccionadas, entre las que se encuentran quimioquinas, citoquinas, moléculas de adhesión, moléculas de señalización, proteasas, factores angiogénicos y receptores solubles, entre muchos otros. El array utilizado permite detectar 1000 proteínas (incluidas citoquinas, quimioquinas, adipoquinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas, receptores solubles, moléculas de adhesión solubles, entre otros).

El primer paso en este sistema de detección es la biotinilización de los grupos amino primarios de las proteínas de la muestra. Después las muestras se bloquean (como se hace en un *Western Blot*), y la muestra biotinilizada se añade al cristal del array, que está imprimado con diferentes anticuerpos. El cristal se incuba para permitir a las proteínas unirse a estos anticuerpos. El compuesto fluorescente (estreptavidina conjugada con Cy3) se aplica al array, y posteriormente éste se seca y se utiliza un escáner para medir la fluorescencia de la muestra (**Figura A1**).

Tebu-Bio llevó a cabo dos análisis diferentes para cada una de las muestras. Como ya se ha indicado, se analizaron los niveles de un total de 1000 proteínas en cada muestra. A su vez, el análisis se realizó de dos maneras distintas, utilizando la herramienta RAYBIO® ANALYSIS TOOL:

- Análisis “*with background*”, en el cual la fluorescencia aportada por el *background* no se resta de la intensidad de fluorescencia total de la muestra.

- Análisis “*without background*”, en la que se resta la fluorescencia aportada por el *background* a cada muestra.

Finalmente, se optó por realizar los posteriores análisis estadísticos a partir de los datos obtenidos de las muestras con *background*, puesto que si se elimina éste del análisis los umbrales de detección de fluorescencia son tan bajos que no permiten la cuantificación de las proteínas del medio. Además, a un porcentaje bajo de suero (como es nuestro caso), la intensidad de fluorescencia de cada muestra no se ve especialmente afectada a la hora de realizar el análisis, sobre todo si la fluorescencia total es particularmente intensa (y, por tanto, de interés).

El siguiente paso es establecer un correcto umbral de detección o *threshold*, para poder determinar la señal real correspondiente a cada muestra (lo que da información de la cantidad de proteína real total). A partir de los datos normalizados del análisis con *background*, se toman como proteínas detectadas aquellas cuyos niveles de fluorescencia están por encima de la intensidad de fluorescencia del control negativo (*Neg*). No obstante, hay varias maneras posibles de seleccionar el *threshold*, dependiendo de lo restrictivo que se quiera ser en la cuantificación de la fluorescencia. Se nos remitió el *raw data* obtenido de dicho análisis y nosotros realizamos un posterior análisis de los resultados bajo nuestros propios criterios.

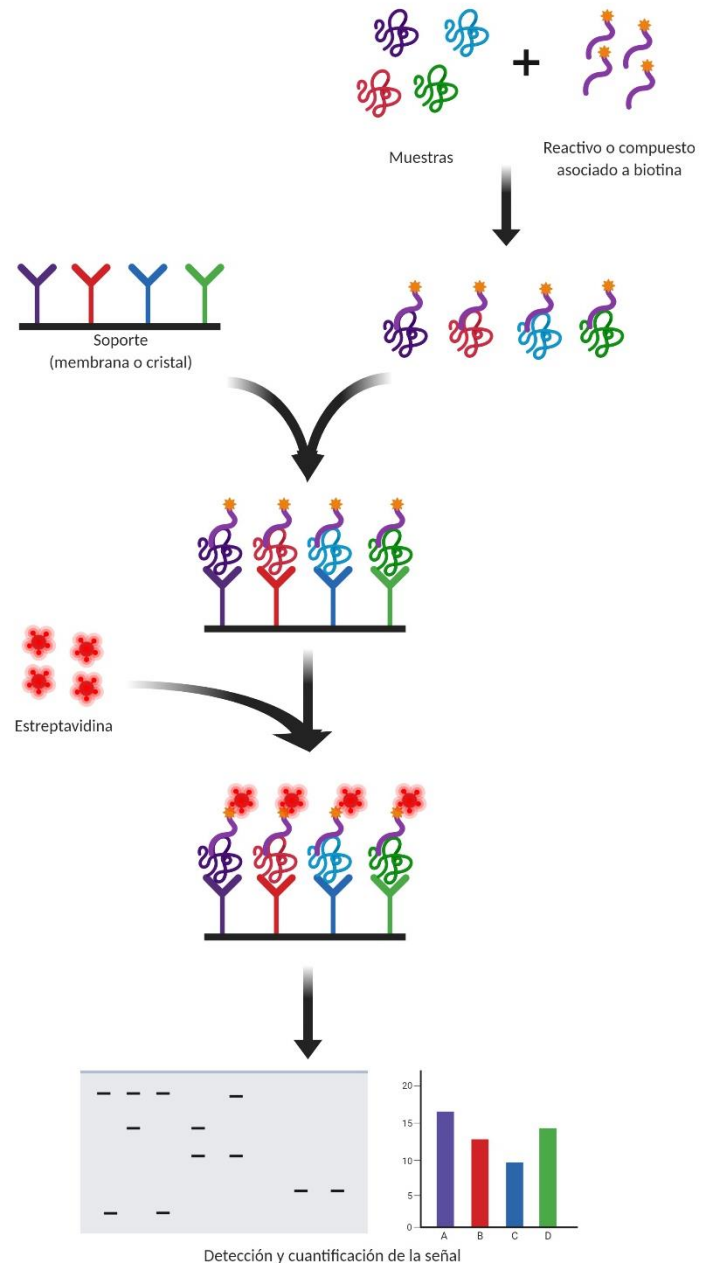


Figura A1: Esquema del procedimiento para la obtención del secretoma y del funcionamiento de los *arrays*. Imagen adaptada de Tebu-bio.com y creada con Biorender.com.

Anexo 2 – Análisis estadístico de los datos generados en el transcriptoma y el secretoma de *Celyvir*.

En primer lugar, se seleccionaron los datos de transcriptoma y secretoma que se querían analizar, basándonos en el análisis llevado a cabo previamente, para poder definir las proteínas diferencialmente expresadas entre los pacientes respondedores y no respondedores. De forma paralela, los procesos “respuesta inmune” y “procesos de replicación viral” se definieron a nivel molecular.

A continuación, se generaron los modelos matemáticos basados en biología de sistemas y se evaluaron por medias de ANNs con el fin de priorizar las proteínas diferencialmente expresadas y las combinaciones de proteínas de acuerdo con la relación potencial que presentaban hacia los procesos de “respuesta inmune al virus” y “replicación viral”.

1) **Procesamiento de los datos.**

El primer paso consistió en la confección de listas que contuvieran las proteínas (secretoma) o genes que iban a ser evaluados (transcriptoma o RNAseq) de las MSC infectadas con ICOVIR5 de los pacientes que respondieron y de los que no. Las proteínas incluidas en este estudio siguieron los siguientes criterios:

- **Secretoma:** Se identificaron 127 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos de pacientes. De ellas, 52 proteínas están sobreexpresadas en el secretoma de los pacientes con respuesta positiva al tratamiento; 69 proteínas están infraexpresadas en ese mismo grupo; y 6 proteínas se detectaron exclusivamente en las muestras procedentes de los respondedores.
- **Transcriptoma (RNAseq):** Se identificaron 113 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos de pacientes ($p < 0.01$). De ellas, 45 proteínas están sobreexpresadas en muestras con una respuesta positiva a *Celyvir*; y 68 proteínas infraexpresadas en ese mismo grupo de pacientes.

Además, se confirmó que las proteínas seleccionadas de los datos del secretoma fueran efectivamente proteínas que son excretadas al exterior por las células. Para ello se utilizaron bases de datos como UniProt y el THPA (*The Human Protein Atlas*).

2) **Caracterización molecular.**

Los procesos “respuesta inmune al virus” y “replicación viral”, se han caracterizado por un protocolo que consta de dos pasos:

- Búsqueda bibliográfica de los procesos celulares y moleculares implicados en cada uno de los procesos biológicos de interés.
- Búsqueda de los sets de proteínas humanas previamente definidos por la base de datos del *Gene Ontology (GO)* (de ahora en adelante definidas como subprocesos) que forman parte de cada uno de los procesos celulares y moleculares definidos en el paso anterior.

Específicamente, 10 procesos diferentes implicados en la “respuesta inmune al virus” y 9 procesos diferentes implicados en “replicación viral” se identificaron en el primer paso, conteniendo cada uno de ellos diferentes subprocesos evaluados por ANNs.

3) **Generación de los modelos matemáticos.**

Para la generación de los modelos matemáticos, Anaxomics construye un mapa biológico alrededor de las proteínas clave de los procesos moleculares definidas durante la caracterización previa. El mapa se extiende añadiendo conexiones o relaciones ya conocidas como, por ejemplo, interacciones proteína-proteína, señalización, relaciones metabólicas, y regulación de la expresión génica. Estos datos se obtienen de bases de datos externas públicas y privadas (KEGG, BIND, BioGRID, REACTOME...) y la literatura ya publicada.

A continuación, los modelos se enfrentan con ayuda de una tabla (*tabla de verdad*, o *Truth Table*) propiedad de Anaxomics que contiene datos de dominio público. Brevemente, para testar los modelos matemáticos, se utiliza una colección de señales fisiológicas de entrada-salida conocidas. Éstas derivan principalmente de la literatura y de un compendio de bases de datos que acumulan conocimiento biológico y médico, como pueden ser bases de datos de *microarrays* (por ejemplo, GEO, BED, PHOSIDA...) y bases de datos de drogas (por ejemplo, DrugBank). Esto es:

- **Modelos de entrada (*inputs*)**, como puede ser información relativa a diversas drogas (proporcionada por DrugBank), ya que éstas tienen la capacidad de inhibir o activar uno o más nodos del modelo (los objetivos) desencadenando una perturbación en todo el sistema.
- **Modelos de salida (*outputs*)**, como puede ser la caracterización molecular de los procesos biológicos de interés (proteínas sobreexpresadas o infraexpresadas tras el tratamiento).

La recolección de estas señales de entrada-salida conocidas genera una lista de reglas fisiológicas o principios que se pueden aplicar a todos los humanos o a una condición fisiopatológica particular. Este conjunto de reglas, o “verdades” se combinan

para formar la “tabla de verdad” o “*truth table*” que debe ser satisfecha por cualquier modelo matemático construido.

- Los modelos deberían ser capaces de reproducir todas y cada una de las reglas contenidas en la tabla de verdad, y el error se calcula como el sumatorio de todas las reglas que el modelo no es capaz de cumplir.
- Los modelos se construyen teniendo en cuenta que cada vínculo en el mapa (conexión entre dos proteínas) se representa por una función doble o triple gobernada por un parámetro desconocido. El número de parámetros desconocidos se corresponde con el número de vínculos o conexiones que contiene la red biológica.

Los modelos deben ser capaces de medir el valor relativo de cada relación de cada proteína (nódulo de la red). Ya que el número de estos vínculos es muy grande, el número de parámetros a resolver también se incrementa exponencialmente. Anaxomics utiliza tecnología de inteligencia artificial (IA) para modelar los complejos comportamientos de estas redes, incluyendo la teoría de gráficos y los patrones estadísticos, los algoritmos genéticos, técnicas de reducción dimensional, etc.

4) *Ranking basado en la biología de sistemas.*

Una vez que los modelos matemáticos se han generado, su poder predictivo se explota mediante la estrategia ANN, para hacer un ranking de la lista de proteínas diferencialmente expresadas de acuerdo a su relación con los procesos de “respuesta inmune al virus” y “replicación viral”.

Específicamente, la relación potencial entre cada proteína diferencialmente expresada y el conjunto de proteínas que definen cada proceso de interés (los subprocesos “respuesta inmune al virus” y “replicación viral”) se han predicho a través de ANNs. El sistema intenta encontrar la distancia más corta entre el conjunto de proteínas y por lo tanto genera una lista de proteínas diferencialmente expresadas ordenadas por su relación con la enfermedad o ruta seleccionada.

Este protocolo aporta un valor predictivo que proporciona una idea de la probabilidad de la existencia de una conexión o relación entre cada una de las proteínas diferencialmente expresadas y los procesos estudiados, basándose en la validación de la capacidad predictiva del modelo hacia lo que está descrito en las bases de datos.

Anexo 3 – Análisis bioinformático del ADN genómico obtenido por NGS.

IDENTIFICACIÓN DE LOS TCR MEDIANTE LA HERRAMIENTA *immunoSEQ*.

A partir de la secuenciación del genoma completo de cada una de las muestras de los tumores, se utilizó la herramienta online ImmunoSEQ ANALYZER (Adaptive Biotechnologies, <https://clients.adaptivebiotech.com/login>) para inferir la abundancia, identidad y reordenamientos de los distintos clones de receptores de células T en las muestras tumorales de la paciente en cada momento de la enfermedad (estabilización y progresión).

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO DE LAS MUESTRAS TUMORALES (WHOLE EXOME SEQUENCING, WES): VARIANT CALLING Y PREDICCIÓN DE NEOEPÍTOPOS.

1. Análisis de calidad de las muestras.

Para realizar el control de calidad (QC) de las muestras se utilizó el software FastQC. Los elementos más importantes a tener en cuenta para valorar la calidad de los datos del genoma completo son: (a) el número de *reads*, lecturas o *coverage* (que son el número de secuencias del archivo fastq) se usó para medir la calidad de cada una de las lecturas (*reads*); (b) la calidad de esos *reads* (es decir, que posean un valor superior a 30 según los estándares del software).

A continuación, y teniendo en cuenta los resultados del control de calidad, se utilizó el software Trimmomatic para hacer un trimeado, es decir, una eliminación de las dos primeras bases de cada uno de los *reads* por tener mala calidad.

Por último, se mapearon los *reads* usando como referencia el genoma humano (hg19/GRCh38), de tal forma que cada *read* se situara en su posición en el genoma; para esto se utilizó en la herramienta BWA MEM.

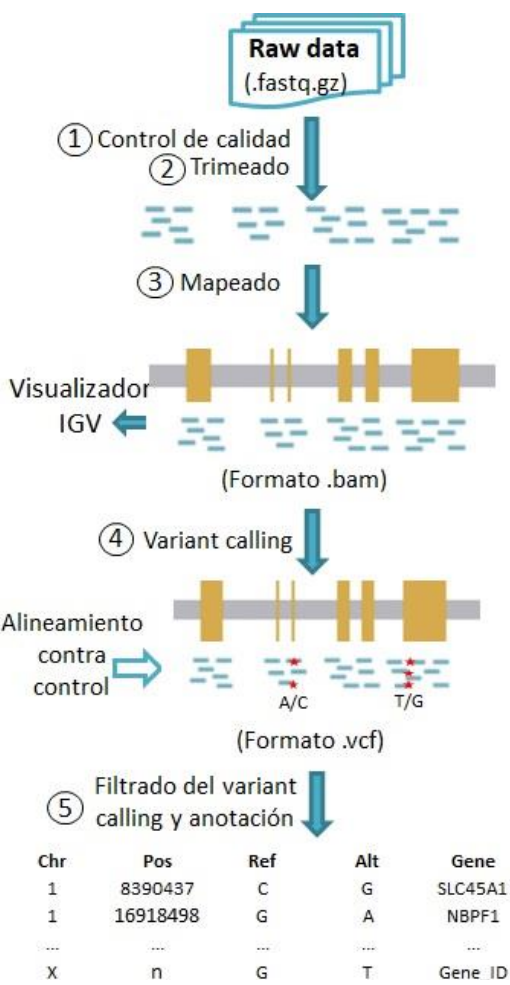


Figura A3.1: Esquema del procedimiento del análisis y calidad de las muestras para el WES

El software Picard se utilizó para realizar una recalibración del realineado y una eliminación de los *reads* duplicados.

La visualización del correcto alineamiento de los *reads* contra el genoma puede realizarse usando el visualizador IGV. Este software permite analizar gráficamente el *coverage* de las muestras, las mutaciones, visualizar un gen de interés, etc.

2. Variant calling.

Una vez realizado el control de calidad y de los *reads* y el alineamiento de las secuencias, se inicia con el *variant calling*. El *variant calling* es el proceso por el cual se identifican las variantes génicas presentes en una muestra. El proceso de *variant calling* se realizó con el software Mutect1, utilizando una muestra pareada como referencia para filtrar los posibles polimorfismos. Las variantes con frecuencias mayores a 10 (frecuencia >10) y DP (*read depth*) mayor a 20 (DP > 20) se seleccionaron y anotaron usando el software Annovar.

3. Predicción de neoepítomos mediante SNV.

3.1 – Software NetMHCCons

Las variantes nucleotídicas únicas (SNV, *Single Nucleotide Variants*) identificadas como mutaciones *missense* (mutaciones sin sentido) se utilizaron para la realización de la predicción de neoepítomos en las muestras tumorales. Para ello, las secuencias humanas con formato FASTA obtenidas a partir del UniProt se usaron para traducir la información obtenida sobre las mutaciones *missense* del ADN a aminoácidos concretos. Para cada una de las mutaciones *missense*, se analizó una secuencia de 19 aminoácidos que contuvieran la mutación de interés con el fin de identificar posibles neoantígenos. El software NetMHCCons se utilizó para identificar péptidos potencialmente inmunogénicos (19 aa; 9 mer) combinando la información del HLA de cada paciente con los péptidos que contenían mutaciones *missense*. Se definió como epítipo inmunogénico aquel péptido que tuviera alta afinidad para un alelo de HLA (IC50<50nM).

3.2.– Software CONDEL.

Se utilizó un segundo software complementario al NetMHCCons para predecir neoepítomos de estas muestras. El software CONDEL (*CONsensus DEleteriousness score of non-synonymous single nucleotide variants*)²⁹⁰, que combina los resultados o *scores* obtenidos de otros softwares para crear su propia lista de posibles mutaciones *missense*, ya sean deletéreas o neutrales. A partir de esto, CONDEL elabora una lista de todas las mutaciones detectadas y detalla cada uno de los parámetros a partir de los cuales se predice el tipo de mutación que origina, así como su posición en el genoma, si la mutación es exónica o no, y el cambio de aminoácido que se origina

(<https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/help/condel.html>). Las herramientas de las que CONDEL se sirve para generar sus resultados son las siguientes:

- SIFT: PMID:19561590
- Polyphen2: PMID:20354512
- MutationAssessor: PMID:21727090
- FatHMM: PMID:23033316
- Ensembl-variation: PMID:20459805

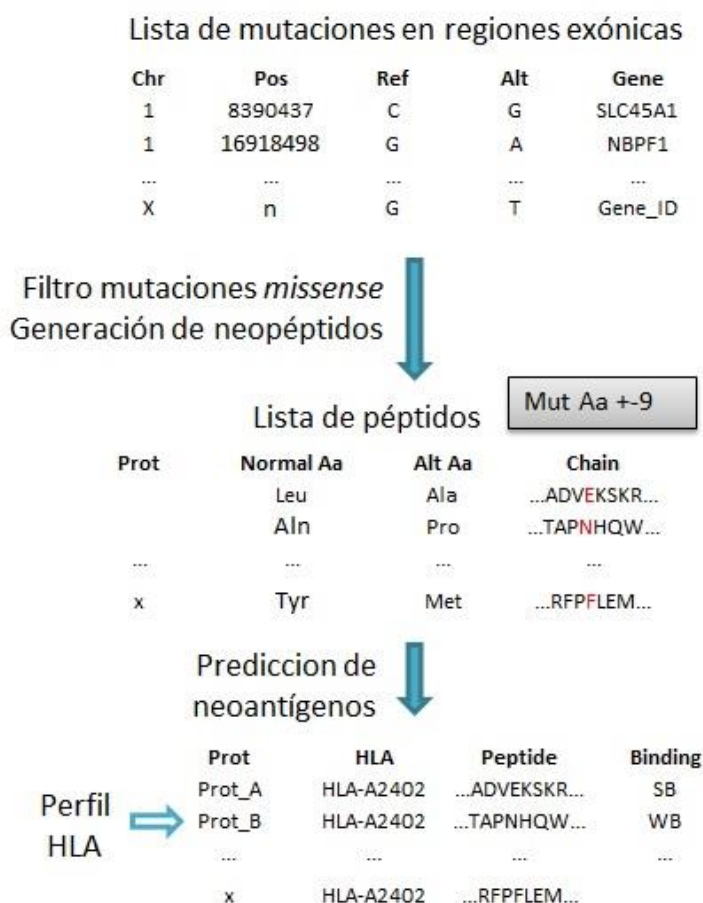


Figura A3.2: Esquema del procedimiento de identificación de neoepítos.

Anexo 4 – Análisis bioinformático del RNA-Seq.

RNA-Seq: MATRIZ DE EXPRESIÓN, GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y ANALISIS FUNCIONAL.

Las muestras de los tumores OLD y NEW se enviaron a Biotechvana para su procesamiento y los estudios de expresión fueron llevados a cabo en la Unidad de Biomarcadores y Susceptibilidad (ICO-Idibell).

1. Bioinformática del RNA-Seq. Generación de la matriz de trabajo.

De cada muestra se obtuvieron 3 replicados técnicos (librerías) con los que trabajar (es decir, se generaron 6 librerías de un total de dos muestras). Se usó el software FastQC para determinar la calidad de las muestras. A continuación, y teniendo en cuenta los resultados del control de calidad, se utilizó el software Trimmomatic para hacer un trimeado, que consiste en filtrar los *reads* (lecturas) de mala calidad (generalmente aquellos *reads* que son demasiado cortos o tienen errores de lectura). Este software también permite retirar los adaptadores de Illumina para continuar con el análisis.

El siguiente paso fue realizar el mapeo de las lecturas (*reads*) usando como referencia el genoma humano (hg19/GRCh38), de tal forma que cada *read* se situara en su posición en el genoma; para esto se utilizó el software STAR. La visualización del correcto alineamiento de los *reads* contra el genoma pudo realizarse usando el visualizador IGV. Este software permite analizar gráficamente el *coverage* de las muestras, las mutaciones, visualizar un gen de interés, etc.

Se generó de esta manera un archivo en formato GTF (descargado de UCSC Table Browser) que incluía 23.687 genes y 41.970 isoformas de transcritos, que se usaron para el paso final de *indexing*. Finalmente, la herramienta RSEM se usó sobre las secuencias alineadas (archivos BAM) para generar una matriz de expresión génica en términos de FPKM (*Fragments per Kilobase per million mapped fragments*; Fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados).

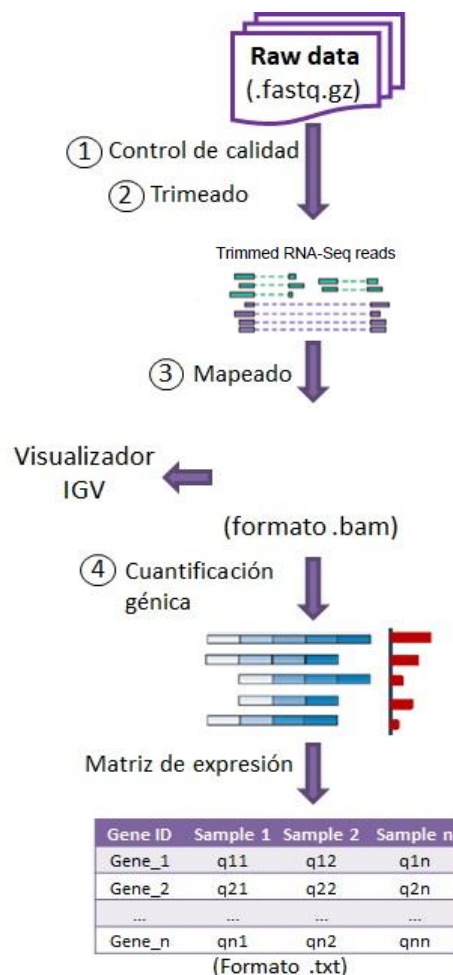


Figura A4: Esquema del procedimiento de la generación de la matriz de trabajo para el RNA-Seq.

2. Análisis del RNA-Seq.

Se partió de la matriz generada, que contenía 6 muestras y 23686 genes. El siguiente paso fue filtrar los genes que tenían más de 1 CPM (*counts per million*) en dos o más muestras. Con este filtro se eliminaron los genes que no se expresaban en las muestras, y que por lo tanto no resultaban de interés. La lista definitiva se compuso entonces de 15968 genes.

Una vez filtrados los genes no expresados, se realizó una normalización TMM (*trimmed mean of M-values*) para reducir la variabilidad no deseada entre las muestras, basándonos en los parámetros *library size* (tamaño de la librería) y *gene length* (longitud del gen).

Para identificar genes diferencialmente expresados (DEG, *Differentially Expressed Genes*) entre ambas condiciones (OLD y NEW), se aplicó un modelo lineal usando el paquete Limma R, que se obtiene de la siguiente manera: *Linear model* → *eBayes comparison* * → *multiple testing FDR*. El modelo genera una tabla con la siguiente información para cada gen:

- logFC de NEW respecto a OLD
- AveExpr**
- P-value
- Adj P-value (ajustado por FDR “false discovery rate”)
- B-statistic*** (por el cual se ordena la tabla)

**El parámetro básico estadístico utilizado para os análisis de significancia es el t-statistic. Tiene la misma interpretación que un test t-statistic ordinario, salvo por el hecho de que los errores estándar se han moderado entre los genes.*

***La columna AveExpr proporciona el nivel medio del log2-expresión para ese gen a lo largo de todos los arrays del experimento.*

****El parámetro B (B-statistic) aporta información sobre cómo de diferencialmente expresado está el gen. Si se supone un valor de $B = 1.5$, las probabilidades de que ese gen se exprese diferencialmente son de $\exp(1,5) = 4.48$. Es decir, aproximadamente cuatro y medio a uno. La probabilidad de que el gen esté diferencialmente expresado es $4.48/(1+4.48)=0.82$. Por lo tanto, la probabilidad de que ese gen se exprese diferencialmente es de un 82%. Un valor B igual a cero se corresponde a una probabilidad uno a uno (1:1) de que el gen esté diferencialmente expresado. El parámetro B se ajusta automáticamente para tests múltiples asumiendo que el 1% de los genes se esperan como diferencialmente expresados. La combinación del p-valor y el parámetro B ordenarán los genes es una tabla en el que el primero será el gen con mayor expresión diferencial.*

Este modelo permitió generar una lista de DEG con un p-valor < 0.01 y logFC > 1,

A continuación, se aplicó el algoritmo GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*)^{291,292} para identificar enriquecimientos en rutas (*pathways*) y funciones celulares concretas (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>).

ANALISIS POR CIBERSORT.

Para analizar qué poblaciones inmunes eran más abundantes en cada una de las muestras analizadas (OLD y NEW) se utilizó la herramienta online CIBERSORT (<https://cibersort.stanford.edu/index.php>), que permite analizar qué poblaciones inmunes se relacionan con un conjunto de genes sobreexpresados²⁹³. Se cruzaron los datos del RNA-Seq obtenidos para cada una de nuestras muestras con la matriz de genes de leucocitos LM22 (aportada por CIBERSORT). Los resultados obtenidos se muestran en la sección Resultados.

ANALISIS POR ESTIMATE SCORE.

Se utilizó la herramienta ESTIMATE (*Estimation of STromal and Immune cells in MAlignant Tumor tissues using Expression data*; <https://rdr.io/rforge/estimate/>) para predecir qué tipo de células inmunes estaban más representadas en el tejido tumoral de cada una de las muestras, así como identificar la pureza tumoral usando diferentes parámetros. Se usaron los datos derivados del RNA-Seq para obtener tres puntuaciones o scores que indicaban la pureza del tejido tumoral y las células inmunes que lo infiltraban (los datos obtenidos se discuten en la sección Resultados):

- **StromalScore:** Cuantifica la presencia de estroma en el tejido tumoral.
- **ImmuneScore:** Representa la infiltración de las células inmunes en el tejido tumoral.
- **ESTIMATEScore:** Identifica la pureza tumoral.

ANALISIS POR QUANTISEQ.

Al igual que ESTIMATE, la herramienta online QuantIseq permite la cuantificación de la carga inmune de una muestra tumoral a partir de los datos obtenidos del RNA-Seq (<https://icbi.med.ac.at/software/quantiseq/doc/index.html>) .

Las células que cuantifica el QuantIseq son las siguientes:

- | | |
|---|------------------------------------|
| • Células B | • Células NK |
| • Macrófagos activados de manera clásica (M1) | • Células CD4+ no regulatorias |
| • Macrófagos activados de manera alternativa (M2) | • Células CD4+ regulatorias (Treg) |
| • Monocitos | • Células CD8+ |
| • Neutrófilos | • Células dendríticas |
| | • Otras células no caracterizadas. |

Anexo 5 – Lista completa de proteínas candidatas proporcionada por Anaxomics.

Protein information			Normalized data treatment					Comparison respect control (green = increased respect control / red = decreased respect control)		
UniProt ID	Entity name (Client's data)	Gene name	Mean RESPONSE	Mean NON-RESPONSE (BGD values in red)	FC (considering BGD Values)	FC (discarding BGD Values)	Candidate (↑ = UP / ↓ = DOWN / → = responders only)	Control value ("Normalized"- "Miguel")	FC RESPONSE vs Control	FC NON-RESPONSE vs Control
P15509	GM-CSF R alpha	CSF2RA	3090,462	2052,477	1,506	1,506	↑	1968,250	1,570	1,043
P09972	Aldolase C	ALDOC	9540,870	6103,481	1,563	1,563	↑	4720,750	2,021	1,293
Q15582	Beta IG-H3	TGFB1	15260,555	6378,789	2,392	1,595	↑	1,000	15260,555	6378,789
Q8IUf8	MINA	RIOX2	5696,805	3556,186	1,602	1,602	↑	3277,000	1,738	1,085
Q9HAV5	XEDAR	EDA2R	663,499	183,946	3,607	1,609	↑	1,000	663,499	183,946
Q9UF33	EphA6	EPHA6	657,238	265,090	2,479	1,656	↑	1,000	657,238	265,090
Q13464	ROCK1	ROCK1	4124,882	2477,788	1,665	1,665	↑	1,000	4124,882	2477,788
O14793	GDF8	MSTN	2522,862	1471,298	1,715	1,715	↑	1,000	2522,862	1471,298
P26441	CNTF	CNTF	2365,897	1322,034	1,790	1,790	↑	2410,500	0,981	0,548
P02741	CRP	CRP	911,444	337,408	2,701	1,803	↑	1043,750	0,873	0,323
Q9NR28	SMAC	DIABLO	857,210	471,485	1,818	1,818	↑	1,000	857,210	471,485
P05231	IL-6	IL6	1117,629	614,007	1,820	1,820	↑	1,000	1117,629	614,007
Q14766	Latent TGF-beta bp1	LTBP1	607,653	194,592	3,123	2,086	↑	320,750	1,894	0,607
Q9Y4X3	CTACK / CCL27	CCL27	1435,245	457,372	3,138	2,094	↑	1715,500	0,837	0,267
Q15628	TRADD	TRADD	216,009	136,109	1,587	2,119	↑	1,000	216,009	136,109
P01588	Erythropoietin	EPO	545,180	338,138	1,612	2,150	↑	131,500	4,146	2,571
O75496	GMNN	GMNN	742,553	430,149	1,726	2,302	↑	2345,250	0,317	0,183
P36896	Activin RIB / ALK-4	ACVR1B	285,254	163,222	1,748	2,334	↑	357,250	0,798	0,457
Q8NCW0	Kremen-2	KREMEN2	172,607	48,998	3,523	2,375	↑	234,750	0,735	0,209
O00451	GFR alpha-2	GFRA2	89,301	50,201	1,779	2,385	↑	1,000	89,301	50,201
P49767	VEGF-C	VEGFC	706,048	190,420	3,708	2,479	↑	1,000	706,048	190,420
P09919	GCSF	CSF3	1430,107	756,272	1,891	2,522	↑	1,000	1430,107	756,272
P28908	CD30 / TNFRSF8	TNFRSF8	379,894	193,465	1,964	2,619	↑	1,000	379,894	193,465
P01215	hCG alpha	CGA	415,682	104,484	3,978	2,668	↑	1,000	415,682	104,484
Q9Y6Q6	RANK / TNFRSF11A	TNFRSF11A	205,624	101,219	2,031	2,711	↑	1,000	205,624	101,219
P21815	IBSP	IBSP	1791,514	577,607	3,102	2,758	↑	52,250	34,287	11,055
P31025	Lipocalin-1	LCN1	114,190	27,860	4,099	2,791	↑	571,500	0,200	0,049
Q6WN34	Chordin-Like 2	CHRD12	381,482	180,896	2,109	2,813	↑	805,000	0,474	0,225
P42680	Tec	TEC	1561,703	306,973	5,087	3,399	↑	1,000	1561,703	306,973
P60568	IL-2	IL2	717,080	280,465	2,557	3,411	↑	1,000	717,080	280,465
P16591	FER	FER	1538,208	296,337	5,191	3,465	↑	329,500	4,668	0,899
P01116	Ras	KRAS	1387,538	150,275	9,233	4,123	↑	1,000	1387,538	150,275
P55103	Activin C	INHBC	679,183	219,281	3,097	4,133	↑	2,750	246,976	79,738
Q9NPD7	Neuritin	NRN1	135,797	43,426	3,127	4,214	↑	1,000	135,797	43,426
P22301	IL-10	IL10	490,636	298,322	1,645	4,384	↑	1,000	490,636	298,322
P62993	Grb2	GRB2	92,292	26,091	3,537	4,806	↑	1,000	92,292	26,091
O15240	VGf	VGf	2758,430	146,480	18,831	6,310	↑	1,000	2758,430	146,480
Q93038	DR3 / TNFRSF25	TNFRSF25	1036,983	143,282	7,237	7,237	↑	1154,250	0,898	0,124
O00220	TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	TNFRSF10A	982,938	81,964	11,992	8,028	↑	1989,500	0,494	0,041
O15146	Musk	MUSK	313,760	48,732	6,438	8,689	↑	1,000	313,760	48,732
P08581	HGFR	MET	460,157	34,222	13,446	9,145	↑	1,000	460,157	34,222
P02671	Fibrinogen	FGA	1326,586	189,988	6,982	9,325	↑	1,000	1326,586	189,988
P02675	Fibrinogen	FGB	1326,586	189,988	6,982	9,325	↑	1,000	1326,586	189,988
P02679	Fibrinogen	FGG	1326,586	189,988	6,982	9,325	↑	1,000	1326,586	189,988
P16109	P-selectin	SELP	277,496	39,238	7,072	9,572	↑	1,000	277,496	39,238
P42685	FRK	FRK	1215,903	83,537	14,555	9,788	↑	1,000	1215,903	83,537
Q9UHG2	ProSAAS	PCSK1N	657,451	37,850	17,370	11,806	↑	1,000	657,451	37,850
P08138	NGF R	NGFR	231,436	11,321	20,444	14,505	↑	1,000	231,436	11,321

P16860	BNP	NPPB	345,191	21,819	15,820	21,784	↑	1,000	345,191	21,819
P13500	MCP-1	CCL2	230,624	6,817	33,831	50,240	↑	1,000	230,624	6,817
P50591	TRAIL / TNFSF10	TNFSF10	175,995	1,970	89,339	91,930	↑	1,000	175,995	1,970
Q6EMK4	Vasorin	VASN	866,142	1,415	612,211	543,900	↑	378,750	2,287	0,004
P04275	VWF	VWF	2923,751	1,130	NA	NA	→	1,000	2923,751	1,130
P05121	PAI-1	SERPINE1	401,919	1,130	NA	NA	→	1,000	401,919	1,130
P54753	EphB3	EPHB3	782,956	1,130	NA	NA	→	1,000	782,956	1,130
Q16620	TRKB	NTRK2	135,818	1,130	NA	NA	→	1,000	135,818	1,130
Q8WXI7	CA 125	MUC16	498,322	1,130	NA	NA	→	1,000	498,322	1,130
Q9H3Y6	SRMS	SRMS	593,165	1,130	NA	NA	→	1,000	593,165	1,130
P05112	IL-4	IL4	1,575	623,481	0,003	0,005	↓	91,750	0,017	6,795
P22003	BMP-5	BMP5	18,287	588,937	0,031	0,040	↓	67,750	0,270	8,693
Q9UBT3	Dkk-4	DKK4	14,166	266,948	0,053	0,067	↓	1,000	14,166	266,948
P42702	LIF R alpha	LIFR	45,135	1065,965	0,042	0,111	↓	580,250	0,078	1,837
O00300	Osteoprotegerin / TNFRSF11B	TNFRSF11B	12,623	123,863	0,102	0,128	↓	432,000	0,029	0,287
P02778	IP-10	CXCL10	192,432	1444,092	0,133	0,133	↓	1549,500	0,124	0,932
P09237	MMP-7	MMP7	439,420	3068,303	0,143	0,191	↓	561,500	0,783	5,464
P05362	ICAM-1	ICAM1	127,867	873,674	0,146	0,194	↓	1,000	127,867	873,674
P16035	TIMP-2	TIMP2	1300,338	5400,193	0,241	0,214	↓	1,000	1300,338	5400,193
Q16568	CART	CARTPT	305,390	1207,099	0,253	0,225	↓	1,000	305,390	1207,099
Q15848	Adiponectin / Acrp30	ADIPOQ	163,414	946,119	0,173	0,229	↓	1358,000	0,120	0,697
Q15109	RAGE	AGER	93,337	537,354	0,174	0,230	↓	159,250	0,586	3,374
P28799	Progranulin	GRN	217,689	612,558	0,355	0,237	↓	1,000	217,689	612,558
P03950	Angiogenin	ANG	85,600	476,271	0,180	0,238	↓	1176,500	0,073	0,405
Q9NP95	FGF-20	FGF20	28,012	127,518	0,220	0,286	↓	359,750	0,078	0,354
P27539	GDF1	GDF1	66,545	580,649	0,115	0,302	↓	535,500	0,124	1,084
Q9P0M4	IL-17C	IL17C	540,884	1542,689	0,351	0,312	↓	1,000	540,884	1542,689
Q92956	HVEM / TNFRSF14	TNFRSF14	278,011	790,887	0,352	0,312	↓	3560,500	0,078	0,222
O15389	Siglec-5/CD170	SIGLEC5	725,166	2289,903	0,317	0,317	↓	1710,000	0,424	1,339
Q02763	Tie-2	TEK	43,756	170,948	0,256	0,336	↓	1,000	43,756	170,948
Q8TEU8	GASP-1 / WFIKKNP	WFIKKN2	27,510	103,893	0,265	0,345	↓	1,000	27,510	103,893
P48023	Fas Ligand	FASLG	636,848	2407,286	0,265	0,352	↓	1718,750	0,371	1,401
P0CG37	Cryptic	CFC1	34,579	127,890	0,270	0,354	↓	1,000	34,579	127,890
P08887	IL-6 R	IL6R	830,866	1486,096	0,559	0,373	↓	719,750	1,154	2,065
Q14005	IL-16	IL16	774,054	2073,860	0,373	0,373	↓	1049,750	0,737	1,976
P35443	Thrombospondin-4	THBS4	88,067	155,610	0,566	0,377	↓	112,500	0,783	1,383
Q9NZH7	IL-1 F8 / FIL1 eta	IL36B	266,622	900,943	0,296	0,394	↓	1,000	266,622	900,943
P37173	TGF-beta RII	TGFBR2	484,731	1601,005	0,303	0,403	↓	486,000	0,997	3,294
P61073	CXCR4 (fusin)	CXCR4	2173,675	5334,234	0,407	0,407	↓	1540,500	1,411	3,463
O95631	Ntn1	NTN1	381,294	1840,196	0,207	0,414	↓	24,000	15,887	76,675
P01127	PDGF-AB	PDGFB	1245,879	2996,976	0,416	0,416	↓	1947,000	0,640	1,539
P04085	PDGF-AB	PDGFA	1245,879	2996,976	0,416	0,416	↓	1947,000	0,640	1,539
Q13261	IL-15 R alpha	IL15RA	272,023	866,869	0,314	0,418	↓	1,000	272,023	866,869
P09603	M-CSF	CSF1	2111,135	4939,748	0,427	0,427	↓	3080,500	0,685	1,604
P21359	NF1	NF1	1322,265	2973,826	0,445	0,445	↓	72,000	18,365	41,303
P02775	NAP-2	PPBP	77,269	457,142	0,169	0,446	↓	1,000	77,269	457,142
P61812	TGF-beta 2	TGFB2	110,101	322,473	0,341	0,453	↓	151,500	0,727	2,129
Q9UHF5	IL-17B	IL17B	2773,867	5927,948	0,468	0,468	↓	2376,000	1,167	2,495
P01189	MSHa	POMC	4389,879	9290,903	0,472	0,472	↓	6344,000	0,692	1,465
P22792	CPN2	CPN2	9945,659	20953,377	0,475	0,475	↓	16803,500	0,592	1,247
O43508	TWEAK / TNFSF12	TNFSF12	46,951	123,137	0,381	0,503	↓	1,000	46,951	123,137
P03956	MMP-1	MMP1	589,855	1555,221	0,379	0,505	↓	1,000	589,855	1555,221
O15123	Angiopoietin-2	ANGPT2	613,487	1467,814	0,380	0,506	↓	547,500	0,426	1,121
P18510	IL-1 ra	IL1RN	753,097	1467,814	0,513	0,513	↓	166,250	4,530	8,829

Q96NZ8	GASP-2 / WFIKK1	WFIKK1	81,483	208,788	0,390	0,517	↓	1,000	81,483	208,788
P00747	Plasminogen	PLG	1903,857	3675,773	0,518	0,518	↓	1,000	1903,857	3675,773
P29320	EphA3	EPHA3	327,596	834,481	0,393	0,523	↓	1,000	327,596	834,481
P40225	Thrombopoietin (TPO)	THPO	741,520	1859,124	0,399	0,532	↓	109,250	6,787	17,017
P51671	Eotaxin / CCL11	CCL11	1453,101	3640,857	0,399	0,532	↓	2284,250	0,636	1,594
Q13007	IL-24	IL24	3486,283	6503,389	0,536	0,536	↓	4911,500	0,710	1,324
P09238	MMP-10	MMP10	2888,379	5273,401	0,548	0,548	↓	3218,000	0,898	1,639
P01236	Prolactin	PRL	850,455	1367,217	0,622	0,553	↓	1962,750	0,433	0,697
P31785	IL-2 R gamma	IL2RG	1324,720	2392,019	0,554	0,554	↓	1098,000	1,206	2,179
P22466	Galanin	GAL	805,627	1453,997	0,554	0,554	↓	213,500	3,773	6,810
P80370	Pref-1	DLK1	2556,814	4614,172	0,554	0,554	↓	1211,000	2,111	3,810
P04217	A1BG	A1BG	1104,136	1945,936	0,567	0,567	↓	1,000	1104,136	1945,936
O95813	Cerberus 1	CER1	1938,214	3356,033	0,578	0,578	↓	1,000	1938,214	3356,033
P11226	MBL-2	MBL2	2709,215	4675,642	0,579	0,579	↓	3092,750	0,876	1,512
Q6FHI7	sFRP-4	SFRP4	599,726	1991,140	0,301	0,602	↓	1,000	599,726	1991,140
P42166	Thymopoietin	TMPO	1155,497	1913,248	0,604	0,604	↓	1739,000	0,664	1,100
P22455	FGF R4	FGFR4	385,364	834,116	0,462	0,615	↓	944,000	0,408	0,884
P07492	GRP	GRP	3472,834	5620,627	0,618	0,618	↓	745,000	4,662	7,544
O43557	LIGHT / TNFSF14	TNFSF14	13590,750	21857,518	0,622	0,622	↓	18663,750	0,728	1,171
Q9H324	ADAMTS-10	ADAMTS10	4206,082	6720,293	0,626	0,626	↓	2879,750	1,461	2,334
P06727	ApoA4	APOA4	5858,804	9190,317	0,637	0,637	↓	5866,250	0,999	1,567
Q969J5	IL-22 BP	IL22RA2	3412,928	5296,464	0,644	0,644	↓	3864,500	0,883	1,371
P39900	MMP-12	MMP12	2878,552	4455,244	0,646	0,646	↓	4248,750	0,678	1,049
O00409	FOXP3	FOXP3	3914,157	8050,702	0,486	0,648	↓	3133,500	1,249	2,569
P01241	Growth Hormone (GH)	GH1	3664,322	5647,774	0,649	0,649	↓	3275,750	1,119	1,724

Anexo 6 – Rutas enriquecidas en el *Celyvir* de los pacientes respondedores y no respondedores.

SOURCE	NAME	SIZE	ES	INES	NOM p-val	FDR q-val
BEDMOTIVE	SUSTAINED ANGIOGENESIS, MELANOMA	10	-0.7330517	-1.8895234	0	0.8992971
GOFUNCTIONI	anaphase-promoting complex binding	4	-0.926026	-1.7948163	0	0.70420945
GOFUNCTIONI	profilin binding	9	-0.6965458	-1.7588112	0	0.58409435
GOFUNCTIONI	hepatocyte growth factor receptor binding	2	-0.9975547	-1.571233	0	0.85716033
GOFUNCTIONI	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, quinone or similar compound as acceptor	2	-0.990488	-1.5316033	0	0.85970247
GOPROCESS	positive regulation of cilium assembly	11	-0.70235735	-1.8963033	0	1
GOPROCESS	regulation of mitochondrial translation	5	-0.8473623	-1.7262168	0	1
GOPROCESS	positive regulation of cytoskeleton organization	3	-0.974624	-1.7043649	0	1
GOPROCESS	glomerular endothelium development	2	-0.9765664	-1.5157875	0	0.97389746
GOPROCESS	mesoderm morphogenesis	2	-0.98648745	-1.5154682	0	0.96168745
GOLOCATION	Cul2-RING ubiquitin ligase complex	7	-0.8142056	-1.8650453	0	0.7348844
GOPROCESS	hyaluronan biosynthetic process	7	-0.7916707	-1.8017257	0.001953125	1
GOPROCESS	positive regulation of protein processing in phagocytic vesicle	2	-0.98835856	-1.5183389	0.002020202	0.96944386
TRRUST	TEAD1	3	-0.9388616	-1.6184286	0.002028398	0.6528544
GOFUNCTIONI	geranyltranstransferase activity	2	-0.97943556	-1.5422269	0.00203666	0.88324314
GOFUNCTIONI	dimethylallyltranstransferase activity	2	-0.97943556	-1.5046871	0.002066116	0.92313856
GOPROCESS	triglyceride homeostasis	12	-0.70191103	-1.9113852	0.002079002	1
GOFUNCTIONI	aryl hydrocarbon receptor binding	9	-0.7253293	-1.8305156	0.002136752	0.63114196
BED	MACULAR_DEGENERATION	123	-0.34498027	-1.60828	0.002314815	0.49024153
GOPROCESS	limbic system development	2	-0.98381096	-1.498981	0.00390625	0.9443675
GOFUNCTIONI	phosphodiesterase I activity	4	-0.9087957	-1.7600716	0.004056795	0.67232156
GOPROCESS	diapdesis	3	-0.929931	-1.6198554	0.004056795	0.97843444
GOPROCESS	positive regulation of cell proliferation by VEGF-activated platelet derived growth factor receptor signaling pathway	3	-0.93290126	-1.6355271	0.004065041	0.9364289
GOPROCESS	macrophage differentiation	13	-0.664933	-1.8181462	0.004081633	1
GOFUNCTIONI	phospholipid transporter activity	9	-0.7358231	-1.8635283	0.00408998	1
BEDMOTIVE	IMPAIRED THYROID FUNCTION	4	-0.8493441	-1.6698405	0.004175365	0.7392668
GOPROCESS	response to iron ion	13	-0.6944306	-1.9323586	0.0041841	1
GOPROCESS	platelet formation	15	-0.62053925	-1.8180586	0.004219409	1
GOPROCESS	positive regulation of ubiquitin protein ligase activity	9	-0.74344707	-1.7808431	0.004329004	1
GOPROCESS	regulation of synaptic vesicle recycling	2	-0.9612047	-1.5005817	0.004338395	0.94412965
GOPROCESS	very-low-density lipoprotein particle remodeling	3	-0.92606044	-1.6117537	0.005736138	0.9649539
GOFUNCTIONI	hedgehog family protein binding	3	-0.9309221	-1.6066151	0.006012024	0.9156394
GOLOCATION	NatO complex	3	-0.90121365	-1.573651	0.006048387	1
GOFUNCTIONI	ATP-dependent helicase activity	8	-0.75428	-1.834883	0.00610998	0.9055298
GOPROCESS	positive regulation of stem cell proliferation	5	-0.8363519	-1.758148	0.006122449	1
BEDPATH	MONOCYTE ADHESION	7	-0.7685332	-1.7639372	0.006147541	0.8662265
GOPROCESS	mast cell activation	4	-0.8729487	-1.69527	0.006147541	0.9109528
GOPROCESS	negative regulation of glycogen biosynthetic process	6	-0.8029483	-1.738381	0.006224067	1
GOPROCESS	long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process	37	-0.45216718	-1.6392314	0.006224067	0.94099283
TRRUST	NRS2A2	7	-0.7826408	-1.8058516	0.00631579	0.79911375
BEDMOTIVE	LEUKOCYTE EXTRAVASATION AT INFLAMMED SITE	28	-0.4908196	-1.7169791	0.006355932	0.71019506
GOFUNCTIONI	calcium-release channel activity	9	-0.6867599	-1.7679455	0.006353948	0.7449412
BEDMOTIVE	BONE MARROW FIBROSIS	11	-0.7000036	-1.8228168	0.006593407	0.9144554
GOPROCESS	hemidesmosome assembly	11	-0.6941735	-1.8195399	0.007490637	1
GOFUNCTIONI	calcium-independent phospholipase A2 activity	4	-0.8645902	-1.6463184	0.007797271	0.8203508
GOPROCESS	farnesyl diphosphate biosynthetic process	2	-0.97943556	-1.5083025	0.00811359	0.96869624
GOPROCESS	multicellular organismal response to stress	3	-0.8925327	-1.5632242	0.008163265	0.90710294

GOPROCESS	sinoatrial node cell development		2	-0.9588005	-1.5012369	0.008163265	0.9514652
BEDMOTIVE	REDUCED HDL LEVELS-HYPERTRIGLYCERIDEMIA		4	-0.84449977	-1.6402756	0.008368201	0.7770202
GOPROCESS	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway		104	-0.34290114	-1.575027	0.008385744	0.9089448
GOPROCESS	regulation of MAPK cascade		28	-0.5022572	-1.7156607	0.008438818	1
BEDMOTIVE	INCREASED PERMEABILITY OF THE VESSELS		38	-0.471017	-1.7276757	0.008492569	0.75942314
BEDMOTIVE	LEUKOCYTE TRANSMIGRATION THROUGH BLOOD VESSEL WALLS, SKIN INFILTRATION		8	-0.74444145	-1.8052932	0.008602151	0.7320492
BED	PRIMARY_MYELOFIBROSIS		20	-0.57940686	-1.794671	0.008791209	0.56641686
GOPROCESS	positive regulation of growth hormone receptor signaling pathway		3	-0.9113847	-1.5626352	0.009541985	0.89291286
GOPROCESS	geranyl diphosphate biosynthetic process		2	-0.97943556	-1.4969473	0.009615385	0.94793457
BEDMOTIVE	LEUKOCYTE TRANSMIGRATION THROUGH BLOOD VESSEL WALLS		7	-0.768243	-1.7723049	0.00990099	0.75759894
GOPROCESS	cytosolic calcium ion transport		2	-0.9393209	-1.4408755	0.00990099	0.89653105
GOPROCESS	hair cycle		6	-0.7998407	-1.7421442	0.009920635	1
GOPROCESS	fusion of virus membrane with host plasma membrane		5	-0.801179	-1.6715527	0.01	0.925927
GOPROCESS	negative regulation of response to cytokine stimulus		5	-0.8278975	-1.6845286	0.01004016	0.8898104
GOPROCESS	striated muscle myosin thick filament assembly		2	-0.9667592	-1.4748596	0.010162601	0.9283111
SMPDB	[SMP00029]SELENOAMINO ACID METABOLISM		11	-0.67415434	-1.7426981	0.010224949	1
BEDMOTIVE	INCREASED AUTOANTIGEN AVAILABILITY		36	-0.44169897	-1.6251378	0.010245902	0.6968084
GOPROCESS	protein K48-linked deubiquitination		19	-0.5555665	-1.7372665	0.010309278	1
GOPROCESS	methylation		14	-0.6226113	-1.7684528	0.010351967	1
GOFUNCTION	cholesterol binding		32	-0.49046168	-1.7031344	0.01039501	0.80369663
GOPROCESS	plasma cell differentiation		2	-0.96237147	-1.4747056	0.010438413	0.92453694
GOPROCESS	calcium ion transmembrane transport		39	-0.4330586	-1.5990375	0.010460251	0.91316015
GOPROCESS	cellular response to cAMP		38	-0.46449503	-1.7228214	0.010706638	1
GOFUNCTION	iodide transmembrane transporter activity		3	-0.89009625	-1.5694135	0.010752688	0.78277385
GOPROCESS	termination of mitochondrial transcription		2	-0.9461824	-1.4606913	0.010799136	0.91655666
GOLOCATION	trans-Golgi network		110	-0.33488172	-1.5247478	0.010893246	1
GOPROCESS	positive regulation of keratinocyte apoptotic process		3	-0.906957	-1.578373	0.011811024	0.9378792
TRRUST	ETV6		5	-0.7875918	-1.6747514	0.011811024	0.69861084
GOPROCESS	metanephric nephron tubule morphogenesis		3	-0.8952742	-1.538651	0.011976048	0.9811566
BEDMOTIVE	LEUKOCYTE CRAWLING ON BLOOD VESSELS		3	-0.88614994	-1.5317019	0.012096774	0.7769098
GOPROCESS	preassembly of GPI anchor in ER membrane		15	-0.57128805	-1.6543227	0.012195122	0.93436956
GOFUNCTION	peptidase inhibitor activity		6	-0.78174615	-1.7091342	0.012269938	0.85204726
GOPROCESS	polyamine metabolic process		7	-0.73078805	-1.6720238	0.012448133	0.94725126
GOFUNCTION	peptide hormone receptor binding		7	-0.75011116	-1.686024	0.012526096	0.848757
GOLOCATION	PAN complex		2	-0.9634043	-1.492004	0.012526096	1
GOFUNCTION	U3 snRNA binding		5	-0.7861669	-1.6725838	0.012605042	0.87682056
GOPROCESS	hydrogen peroxide catabolic process		12	-0.634065	-1.706841	0.012658228	1
GOPROCESS	protein glycosylation		65	-0.370945	-1.5242754	0.013015185	0.95327115
GOPROCESS	extracellular matrix organization		148	-0.29355702	-1.4026206	0.013100437	0.92303175
BEDMOTIVE	HYPER-PERMEABILITY		25	-0.5153128	-1.6949376	0.013215859	0.75400746
GOFUNCTION	cation		2	-0.9422063	-1.4251376	0.01330377	0.95286393
GOPROCESS	regulation of endothelial cell differentiation		2	-0.9528185	-1.4819126	0.013358778	0.92685086
GOPROCESS	response to hepatocyte growth factor		2	-0.95507914	-1.4932097	0.013806706	0.92344767
GOFUNCTION	ribonuclease III activity		3	-0.9200009	-1.6003214	0.013972056	0.87355465
GOPROCESS	heart formation		2	-0.9474873	-1.4852421	0.014	0.9236032
GOPROCESS	positive regulation of cell activation		2	-0.93411624	-1.4391629	0.014056225	0.89366094
GOPROCESS	translational attenuation		2	-0.9625389	-1.4891752	0.014112903	0.93709505
GOPROCESS	response to vitamin B1		2	-0.95568043	-1.4694208	0.014141414	0.9110853

GOPROCESS	triglyceride transport		2	-0.9554986	-1.475579	0.014227643	0.92798936
GOPROCESS	abortive mitotic cell cycle		2	-0.95212156	-1.4869388	0.014344262	0.9317929
BEDMOTIVE	INCREASED ROS		22	-0.51183844	-1.630478	0.014403292	0.7163278
GOPROCESS	posttranslational protein targeting to membrane, translocation		2	-0.93903595	-1.4714308	0.014403292	0.90570325
GOFUNCTIONI	fibronectin binding		24	-0.49587837	-1.6161758	0.01443299	0.9425816
GOPROCESS	asymmetric Golgi ribbon formation		2	-0.95133775	-1.4575773	0.014492754	0.9175922
GOPROCESS	negative regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation		7	-0.7182283	-1.6665024	0.014553014	0.898698
GOFUNCTIONI	muscle alpha-actinin binding		7	-0.7211041	-1.6711823	0.014644352	0.8142348
SMPDB	[SMP00570]HOMOCYSTINURIA-MEGALOBlastic ANEMIA DUE TO DEFECT IN COBALAMIN METABOLISM, CBLG COMPLEMENTATION TYPE		16	-0.5567982	-1.6427863	0.015151516	1
GOPROCESS	transmission of nerve impulse		10	-0.6649351	-1.7046894	0.015317286	1
GOLOCATION	nuclear pore central transport channel		5	-0.7779568	-1.576577	0.015384615	1
GOFUNCTIONI	8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA binding		2	-0.9362902	-1.4608845	0.015414258	0.9349251
GOFUNCTIONI	nucleotide diphosphatase activity		2	-0.94996583	-1.4655961	0.015717093	0.98186266
GOPROCESS	regulation of meiotic nuclear division		5	-0.7989546	-1.6588122	0.015904572	0.91909
GOPROCESS	negative regulation of interleukin-8 biosynthetic process		3	-0.91032755	-1.5694621	0.015936255	0.9002052
GOPROCESS	regulation of cell communication by electrical coupling		4	-0.82393384	-1.5629522	0.016	0.89983666
GOPROCESS	platelet morphogenesis		2	-0.9375046	-1.4552574	0.016032064	0.90882635
BEDMOTIVE	INCREASED ADIPOSITY-WEIGHT_GAIN		4	-0.83771056	-1.6035688	0.016064256	0.6158357
GOFUNCTIONI	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism		6	-0.755005	-1.6642663	0.01622718	0.8012837
GOPROCESS	regulation of SNARE complex assembly		5	-0.7773598	-1.6511186	0.016260162	0.94063836
TRRUST	SREBF1		20	-0.5480256	-1.7508944	0.016260162	0.7004461
GOPROCESS	homologous chromosome segregation		4	-0.86566544	-1.6419286	0.016393442	0.95815355
GOPROCESS	regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle		21	-0.5320452	-1.7066842	0.016460905	1
BED	PHARYNGITIS		41	-0.42118824	-1.5719361	0.016563147	0.51572925
GOPROCESS	muscle cell differentiation		12	-0.6199359	-1.7131466	0.016563147	1
GOPROCESS	actin filament severing		7	-0.7328226	-1.6932663	0.016666668	0.90042347
GOPROCESS	lipid homeostasis		18	-0.5678005	-1.6989185	0.016771488	0.94017893
GOPROCESS	cytoskeleton organization		88	-0.32968575	-1.4436418	0.017369727	0.8960741
BEDMOTIVE	IMPAIRED EFFEROCTOSIS		5	-0.8118237	-1.6249949	0.01764706	0.65404844
GOFUNCTIONI	inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate 3-phosphatase activity		2	-0.94071317	-1.4741732	0.01778656	1
GOFUNCTIONI	mitochondrion targeting sequence binding		3	-0.881097	-1.5128715	0.017892644	0.92936504
GOPROCESS	positive regulation of synapse maturation		8	-0.6961059	-1.7002544	0.017928287	0.96208835
GOFUNCTIONI	peptide alpha-N-acetyltransferase activity		5	-0.772032	-1.6053394	0.018255578	0.8792392
GOFUNCTIONI	quaternary ammonium group transmembrane transporter activity		2	-0.9422063	-1.4384394	0.018292682	0.91981316
GOPROCESS	replication fork protection		6	-0.77272207	-1.6879148	0.018367346	0.8890114
GOPROCESS	regulation of postsynaptic density protein 95 clustering		3	-0.90101683	-1.5949893	0.018404908	0.89508116
GOPROCESS	C21-steroid hormone biosynthetic process		8	-0.722194	-1.7122961	0.018480493	1
GOPROCESS	insulin receptor internalization		2	-0.9528185	-1.4943502	0.018556701	0.9434707
GOPROCESS	T-helper 1 cell activation		2	-0.9441612	-1.4717642	0.018656716	0.90795434
BEDMOTIVE	INCREASED PLATELET DESTRUCTION		7	-0.75901204	-1.729604	0.0186722	0.8970252
SMPDB	[SMP00214]S-ADENOSYLHOMOCYSTEINE (SAH) HYDROLASE DEFICIENCY		16	-0.5567982	-1.6633792	0.0186722	1
GOFUNCTIONI	g-protein coupled acetylcholine receptor activity		2	-0.94062597	-1.4767928	0.018867925	1
GOPROCESS	low-density lipoprotein particle remodeling		5	-0.80252236	-1.6206096	0.018907564	1
GOPROCESS	camera-type eye development		30	-0.45826745	-1.5700525	0.018907564	0.91541976
GOFUNCTIONI	tumor necrosis factor receptor binding		19	-0.5284716	-1.6263965	0.019067796	0.91550136
GOPROCESS	cellular homeostasis		9	-0.69615823	-1.7029225	0.019189766	0.97504884
GOPROCESS	T-helper 1 type immune response		8	-0.71537274	-1.7038996	0.01968504	1
BEDMOTIVE	DIGESTIVE PROBLEMS_INFANTILE COLIC		2	-0.94062597	-1.440867	0.019723866	0.71563554

GOPROCESS	mitotic spindle assembly		26	-0,47462523	-1,5935925	0,019736841	0,8819886
GOLOCATION	HOPS complex		6	-0,7641735	-1,6689066	0,01980198	1
GOPROCESS	triglyceride metabolic process		24	-0,4874209	-1,6402693	0,019823788	0,951888
GOLOCATION	dense fibrillar component		2	-0,94829726	-1,4861728	0,01992032	1
GOPROCESS	negative regulation of phospholipase A2 activity		2	-0,95289576	-1,4634124	0,01996008	0,9142182
BEDMOTIVE	SWEATING		2	-0,94062597	-1,4617522	0,020120725	0,75004625
GOPROCESS	response to mercury ion		5	-0,76460457	-1,6032156	0,020491803	0,93285024
GOPROCESS	regulation of innate immune response		12	-0,6270253	-1,7051275	0,02053388	1
TRRUST	REST		19	-0,5197042	-1,6235144	0,02053388	0,7303473
GOPROCESS	detection of chemical stimulus involved in sensory perception of pain		3	-0,8774796	-1,5292858	0,020661157	0,96179986
BEDMOTIVE	ALTERED CA2+ HOMEOSTASIS IN AGEING NEURONS		23	-0,49933678	-1,623873	0,020833334	0,5868604
GOPROCESS	epithelial tube branching involved in lung morphogenesis		10	-0,65705687	-1,691212	0,020876827	0,8891332
GOPROCESS	lymph vessel morphogenesis		2	-0,9397652	-1,4574684	0,02096436	0,9142679
GOFUNCTION	SH3 domain binding		96	-0,33334306	-1,4708835	0,021141648	1
GOFUNCTION	ubiquitin-protein transferase activator activity		6	-0,7632173	-1,6506824	0,021321962	0,8469095
GOPROCESS	sulfur amino acid metabolic process		9	-0,658172	-1,6824949	0,021321962	0,88149637
GOPROCESS	insulin catabolic process		2	-0,9479326	-1,4559299	0,021359224	0,9123911
GOPROCESS	negative regulation of T cell proliferation		21	-0,5150476	-1,6365117	0,021367522	0,94582313
BEDMOTIVE	REMYELINATION		26	-0,47757402	-1,6210643	0,021413276	0,5691048
GOFUNCTION	calcium		4	-0,82706565	-1,6119661	0,021442495	0,9231665
BED	MULTIPLE_SCLEROSIS		128	-0,29814318	-1,3921806	0,021598272	0,65076125
BED	PURPURA		17	-0,5807833	-1,7166417	0,021645023	0,54339904
SMPDB	[SMP00340]METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE DEFICIENCY (MTHFRD)		16	-0,5567982	-1,628819	0,02173913	1
GOPROCESS	oxidative phosphorylation		9	-0,68509865	-1,728872	0,021881837	1
GOPROCESS	vitamin K metabolic process		4	-0,83776075	-1,5777458	0,021956088	0,91003627
GOLOCATION	cullin-RING ubiquitin ligase complex		6	-0,7542984	-1,643012	0,022494888	1
GOPROCESS	3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate metabolic process		8	-0,70657724	-1,6981796	0,022821577	0,9148511
GOPROCESS	protein deubiquitination		227	-0,26130235	-1,3310333	0,022988506	0,9262953
BEDMOTIVE	BBB ADHESION AND DESTRUCTION		26	-0,46593246	-1,5860147	0,023012552	0,6665204
SMPDB	[SMP00177]CYSTATHIONINE BETA-SYNTHASE DEFICIENCY		16	-0,5567982	-1,6275799	0,02330097	0,8828679
GOPROCESS	midbrain dopaminergic neuron differentiation		6	-0,728566	-1,571883	0,023305085	0,911743
GOPROCESS	negative regulation of type I interferon production		28	-0,4532193	-1,5399553	0,023605151	0,9801211
SMPDB	[SMP00221]METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE DEFICIENCY		16	-0,5567982	-1,6254569	0,023605151	0,78595364
GOLOCATION	CuI4A-RING E3 ubiquitin ligase complex		9	-0,67118007	-1,6979078	0,02366864	1
GOPROCESS	negative regulation of activation-induced cell death of T cells		4	-0,8282177	-1,614806	0,023762377	0,98742396
GOLOCATION	R2TP complex		4	-0,81461686	-1,541759	0,023913043	1
BEDMOTIVE	DECREASED ADIPOSITY		4	-0,83771056	-1,5818404	0,024048096	0,6550803
BEDMOTIVE	INFLAMMATION DUE TO INFECTION		2	-0,94062597	-1,4690579	0,024048096	0,7537967
GOPROCESS	negative regulation of homotypic cell-cell adhesion		2	-0,9178152	-1,4396248	0,024242423	0,89418894
BED	HYPERTRIGLYCERIDEMIA		10	-0,6594946	-1,6981913	0,024291499	0,41792467
TRRUST	ID3		2	-0,9336367	-1,4671025	0,024291499	0,9360707
GOPROCESS	cellular response to leptin stimulus		8	-0,7227774	-1,7056825	0,024539877	1
GOPROCESS	negative regulation of cerebellar granule cell precursor proliferation		2	-0,9278984	-1,4212128	0,024691358	0,8926897
GOFUNCTION	phosphopantetheine binding		2	-0,94311965	-1,4812387	0,024793388	1
GOLOCATION	sarcoplasm		7	-0,71676904	-1,6563406	0,024896266	1
GOPROCESS	unsaturated fatty acid biosynthetic process		7	-0,7234161	-1,6666323	0,02504817	0,9197822
GOPROCESS	entry of bacterium into host cell		10	-0,64405936	-1,6057248	0,025052192	0,9544257
GOPROCESS	negative regulation of dephosphorylation		3	-0,8840257	-1,5247116	0,025145067	0,95760906

BEDPATH	EOSINOPHIL DIFFERENTIATION	5	-0.7833629	-1.5799621	0.025157232	1
BEDMOTIVE	ALTERED FATTY ACID METABOLISM	25	-0.5072779	-1.6823761	0.025157232	0.74537414
GOPROCESS	adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	2	-0.94062597	-1.4487618	0.02534113	0.8949791
TRRUST	PKNOX1	3	-0.87895304	-1.5189022	0.02534113	0.8386173
GOFUNCTION	telomeric D-loop binding	3	-0.85424334	-1.4801054	0.025423728	1
SMPDB	[SMP00341]HYPERMETHIONINEMIA	16	-0.5567982	-1.6313105	0.025423728	1
GOPROCESS	response to ethanol	71	-0.3442065	-1.4579595	0.025586354	0.91892445
BEDMOTIVE	LEUKOCYTE CRAWLING ON BLOOD VESSELS_SKIN INFILTRATION	3	-0.88614994	-1.5226974	0.025590552	0.792859
GOLOCATION	terminal web	4	-0.8068028	-1.5765823	0.025590552	1
GOFUNCTION	double-stranded DNA 3-5 exodeoxyribonuclease activity	2	-0.92977464	-1.4573661	0.025742574	0.9166404
GOPROCESS	inositol phosphate biosynthetic process	5	-0.7726938	-1.5993594	0.025917927	0.9363661
BEDMOTIVE	LIGHT AND OXIDATIVE STRESS: LIPID OXIDATION, LIPOFUSCIN, AGES	16	-0.56459975	-1.6434336	0.026086956	0.8287195
TRRUST	NFE2L2	13	-0.6164965	-1.7330219	0.026104419	0.55366284
GOPROCESS	anion transmembrane transport	10	-0.6156188	-1.5583459	0.026258206	0.8879791
GOPROCESS	response to insecticide	2	-0.9347569	-1.4440732	0.026748972	0.8969008
GOPROCESS	negative regulation of fatty acid biosynthetic process	8	-0.669869	-1.6068622	0.026804123	0.99097604
GOPROCESS	phosphatidylethanolamine catabolic process	2	-0.9440357	-1.4711316	0.027833002	0.9034326
GOPROCESS	cholesterol biosynthetic process	31	-0.43316728	-1.5262287	0.02783726	0.9533993
GOPROCESS	regulation of DNA-templated transcription, elongation	10	-0.62114275	-1.6033981	0.027896997	0.9452639
GOPROCESS	intracellular receptor signaling pathway	8	-0.67360467	-1.6138723	0.027944112	0.9626636
BED	ERYTHEMA	10	-0.6423797	-1.6314534	0.027956989	0.5137014
GOLOCATION	glycosylphosphatidylinositol-N-acetylglucosaminyltransferase (GPI-GnT) complex	7	-0.6798125	-1.5735524	0.028199567	1
GOPROCESS	quaternary ammonium group transport	2	-0.9422063	-1.4660724	0.028225806	0.92179835
GOPROCESS	positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	6	-0.7469134	-1.6280457	0.028282829	0.96264696
GOPROCESS	fat pad development	3	-0.8742287	-1.5031432	0.028513238	0.962313
GOLOCATION	actin cap	4	-0.81390125	-1.5577632	0.028513238	1
GOPROCESS	protein K11-linked deubiquitination	9	-0.68384904	-1.6467947	0.028571429	0.9554669
GOPROCESS	triglyceride catabolic process	12	-0.5963293	-1.6057655	0.028761063	0.9688688
GOPROCESS	regulation of protein deacetylation	3	-0.8652851	-1.5201958	0.02892562	0.9699332
GOPROCESS	negative regulation of epithelial cell proliferation	44	-0.39873263	-1.5352674	0.029106028	0.9640101
GOPROCESS	cuticle development	2	-0.9364836	-1.4489495	0.029126214	0.8973352
BEDMOTIVE	REDUCED HDL LEVELS-HYPERLIPIDEMIA	4	-0.84449977	-1.5533739	0.029166667	0.726846
GOPROCESS	maintenance of protein location in nucleus	12	-0.59845424	-1.6305099	0.029279279	0.96031797
BED	PAIN_NEUROPATHIC	67	-0.33896384	-1.437993	0.029545454	0.68211377
GOPROCESS	regulation of cell-cell adhesion	5	-0.7597414	-1.596345	0.029787235	0.8967069
GOFUNCTION	telomeric G-quadruplex DNA binding	2	-0.9362902	-1.4548781	0.030120483	0.87992203
GOPROCESS	phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	2	-0.94062597	-1.4510443	0.030131826	0.91763777
GOFUNCTION	TFIID-class transcription factor binding	7	-0.6966516	-1.5710728	0.030241935	0.8274858
GOPROCESS	phosphatidylcholine catabolic process	3	-0.87135804	-1.5031842	0.030434782	0.9684284
BEDMOTIVE	CHANGES IN PROSTATE STEM CELL POPULATION	6	-0.7337672	-1.6240859	0.030501109	0.62026244
GOPROCESS	cellular response to Thyroglobulin triiodothyronine	2	-0.9394735	-1.4280009	0.03065134	0.89311296
GOPROCESS	regulation of apoptotic process	153	-0.2853055	-1.3602781	0.031311991	0.9243188
GOPROCESS	regulation of epidermis development	3	-0.8528658	-1.5142964	0.031380754	0.9636087
GOPROCESS	negative regulation of protein kinase B signaling	31	-0.44670415	-1.5648286	0.031390134	0.91459966
GOPROCESS	thermoception	3	-0.8519545	-1.5291386	0.031620555	0.9550283
GOFUNCTION	choline transmembrane transporter activity	4	-0.8143323	-1.5886315	0.031746034	0.8748403
GOFUNCTION	forked DNA-dependent helicase activity	2	-0.9362902	-1.4617779	0.032	0.9440503
GOPROCESS	sequestering of triglyceride	2	-0.90694964	-1.4388697	0.032128513	0.8921559

GOPROCESS	negative regulation of mitochondrial DNA replication	3	-0,8699965	-1,485518	0,032258064	0,92652977
SMPDB	[SMP00222]GLYCINE N-METHYLTRANSFERASE DEFICIENCY	16	-0,5567982	-1,6010388	0,03245436	0,8292632
GOLOCATION	autophagosome	58	-0,37424964	-1,4993838	0,032467533	1
GOPROCESS	post-embryonic camera-type eye development	4	-0,83290553	-1,5696217	0,032882012	0,90877473
BEDPATH	PHENOTYPIC CHANGES DURING MDC MATURATION	17	-0,53371495	-1,6034247	0,03292181	1
GOPROCESS	dATP catabolic process	3	-0,8557017	-1,4813352	0,033009708	0,9210618
KEGG	04150_MTOR SIGNALING PATHWAY	126	-0,2891625	-1,347318	0,033557046	1
GOPROCESS	positive regulation of TORC1 signaling	7	-0,70986116	-1,6638534	0,033826638	0,8991416
BEDMOTIVE	DECREASE OF COAGULATION CAPABILITY-HEMORRHAGE	28	-0,43695828	-1,5182432	0,033970278	0,7596441
GOFUNCTION	GDP binding	52	-0,36160144	-1,4570036	0,03426124	0,9049164
SMPDB	[SMP00033]METHIONINE METABOLISM	16	-0,5567982	-1,6393871	0,034408603	1
BEDMOTIVE	SUSTAINED ANGIOGENESIS_UTERINE_CERVICAL_NEOPLASMS	2	-0,9319759	-1,4206437	0,03469388	0,7060484
BEDPATH	HEMIDESMOSOME	8	-0,6557765	-1,5699464	0,035051547	1
GOPROCESS	vasculogenesis	41	-0,406795	-1,5359142	0,03524229	0,96741515
GOFUNCTION	vascular endothelial growth factor receptor binding	3	-0,84936106	-1,4754215	0,03550296	1
GOPROCESS	striated muscle atrophy	2	-0,92882663	-1,4496273	0,035580523	0,9005996
GOPROCESS	positive regulation of cholesterol homeostasis	5	-0,7604874	-1,5922449	0,035714287	0,8697124
GOFUNCTION	NAD(P)H oxidase activity	3	-0,8458999	-1,4881383	0,035785288	1
GOFUNCTION	cholesterol transporter activity	12	-0,58158034	-1,5915775	0,035789475	0,89516246
GOPROCESS	response to fluoride	2	-0,9088474	-1,421365	0,035928145	0,89470196
GOPROCESS	response to prostaglandin E	4	-0,8012819	-1,5323164	0,035940804	0,9621823
GOPROCESS	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	3	-0,85778576	-1,5012653	0,035984848	0,95752525
TRRUST	GATA2	9	-0,6306028	-1,5823122	0,036	0,7683435
GOFUNCTION	receptor antagonist activity	4	-0,81969106	-1,5399781	0,03629032	0,84872687
GOPROCESS	response to activity	28	-0,4627085	-1,5908055	0,03655914	0,8584038
GOPROCESS	regulation of inflammatory response	44	-0,3854406	-1,4811445	0,036659878	0,9173541
BEDMOTIVE	DECREASE THE EFFECTS OF CHOLINERGIC RECEPTORS	20	-0,52461094	-1,6391752	0,036734693	0,7221162
TRRUST	NR1H3	7	-0,71176374	-1,5767969	0,037037037	0,7102523
GOFUNCTION	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase activity	2	-0,91990566	-1,4331468	0,037475344	0,9321284
GOLOCATION	paranode region of axon	7	-0,7079743	-1,624657	0,03757829	1
GOPROCESS	L-phenylalanine catabolic process	8	-0,6711081	-1,6203865	0,037623763	0,9913155
GOPROCESS	positive regulation of protein kinase C signaling	4	-0,79436326	-1,4857079	0,037623763	0,93038034
GOPROCESS	negative regulation of energy homeostasis	2	-0,9320353	-1,4338719	0,037623763	0,89100605
GOPROCESS	gastric acid secretion	3	-0,85033816	-1,4944272	0,037656903	0,94869417
GOPROCESS	protein localization to paranode region of axon	3	-0,83425194	-1,466255	0,037848607	0,9250069
TRRUST	SOX4	8	-0,6863373	-1,6570419	0,037924152	0,6602189
GOPROCESS	negative regulation of lysosomal protein catabolic process	2	-0,9212426	-1,4180245	0,03815261	0,885744
GOPROCESS	positive regulation of microtubule plus-end binding	2	-0,9264931	-1,450563	0,038306452	0,9096068
GOFUNCTION	fatty acid binding	7	-0,6968335	-1,578537	0,03846154	0,8737154
GOFUNCTION	interferon-gamma receptor activity	2	-0,9228975	-1,4314709	0,03846154	0,93196476
GOPROCESS	regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway	12	-0,5974916	-1,6192069	0,03846154	0,9664701
GOPROCESS	negative regulation of vascular permeability	8	-0,65156585	-1,5330012	0,03846154	0,9737967
GOPROCESS	siRNA loading onto RISC involved in RNA interference	4	-0,7799577	-1,5095334	0,03846154	0,97269475
BEDMOTIVE	HEREDITARY BREAST CANCER	3	-0,87446934	-1,518434	0,038854804	0,7859409
GOPROCESS	membrane protein ectodomain proteolysis	15	-0,5722795	-1,6669979	0,039045554	0,9396495
GOPROCESS	Notch receptor processing	10	-0,6408052	-1,6000147	0,039417909	0,9446114
GOPROCESS	prostate epithelial cord arborization involved in prostate glandular acinus morphogenesis	3	-0,84168756	-1,4889785	0,039447132	0,933024
GOLOCATION	inhibin-beta/glycan-ActRII complex	2	-0,9097913	-1,417882	0,03960396	1

BED	IMMUNE_INFILTRATION_SKIN		32	-0,41880935	-1,4877925	0,039915968	0,78746253
GOPROCESS	viral RNA genome replication		8	-0,66848636	-1,5927751	0,039915968	0,8766547
GOPROCESS	positive regulation of interleukin-10 biosynthetic process		2	-0,91905063	-1,4260423	0,03992016	0,9025998
GOFUNCTION	RNA-intron endonuclease activity		3	-0,8511063	-1,4766394	0,04024145	1
GOPROCESS	positive regulation of keratinocyte proliferation		5	-0,7355968	-1,5297161	0,040339705	0,97427166
GOPROCESS	homocysteine catabolic process		3	-0,8670112	-1,5190216	0,040733196	0,9713903
GOFUNCTION	opsin binding		2	-0,90731424	-1,3832961	0,04106776	0,87056804
GOFUNCTION	enzyme regulator activity		15	-0,54795325	-1,5747494	0,041152265	0,8668884
GOPROCESS	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen		14	-0,57861644	-1,6141709	0,041237112	0,9761872
GOPROCESS	positive regulation of cell projection organization		3	-0,82167906	-1,44861	0,04140787	0,89227295
SMPDB	[SMP00009]AMMONIA RECYCLING		11	-0,59055763	-1,6002651	0,04140787	0,7496161
BEDPATH	EOSINOPHIL PROGENITOR DIFFERENTIATION		6	-0,7131555	-1,5605844	0,041493777	0,87554556
GOPROCESS	store-operated calcium entry		7	-0,7147253	-1,6437247	0,04157549	0,9629264
GOPROCESS	negative regulation of glucose import		6	-0,72339064	-1,5968627	0,041753653	0,91743064
GOFUNCTION	hydrogen		4	-0,7931994	-1,5106163	0,042226486	0,9243555
GOFUNCTION	JAK pathway signal transduction adaptor activity		2	-0,90089697	-1,4214089	0,04233871	0,9435928
GOFUNCTION	NAD+ nucleosidase activity		2	-0,8944797	-1,375056	0,042424243	0,87490004
BEDMOTIVE	SUSTAINED ANGIOGENESIS_CANCER		51	-0,363034	-1,4371645	0,042462844	0,6900548
SMPDB	[SMP00716]THYROID HORMONE SYNTHESIS		5	-0,7527185	-1,5483205	0,04255319	0,97314554
GOPROCESS	negative regulation of beta-amyloid clearance		2	-0,91095084	-1,3895812	0,042596348	0,92428195
GOPROCESS	actin polymerization or depolymerization		11	-0,5902965	-1,5433657	0,042682927	0,9632321
KEGG	00860_PORPHYRIN AND CHLOROPHYLL METABOLISM		18	-0,5099627	-1,5439246	0,042944785	1
GOPROCESS	male mating behavior		3	-0,8433489	-1,4728	0,043222003	0,91447014
GOPROCESS	sensory perception of sweet taste		4	-0,7914736	-1,5008888	0,04347826	0,9480746
GOFUNCTION	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding		36	-0,39011168	-1,4152883	0,04357798	0,94068253
GOFUNCTION	S-adenosyl-L-methionine binding		3	-0,83184546	-1,4653136	0,044025157	0,96674615
GOFUNCTION	ephrin receptor binding		22	-0,47832987	-1,5508372	0,044088177	0,84938616
GOPROCESS	secondary heart field specification		6	-0,7209194	-1,562504	0,044088177	0,8849403
GOFUNCTION	cupric ion binding		2	-0,9000555	-1,4085807	0,044303797	0,9223633
GOPROCESS	spindle localization		4	-0,78739375	-1,5364401	0,044444446	0,9808603
TRRUST	PTTG1		15	-0,52678114	-1,5279664	0,044680852	0,850302
BEDMOTIVE	JOINT INFLAMMATION_SACROILIITIS		25	-0,45640385	-1,4978938	0,044705883	0,74026513
GOPROCESS	negative regulation of non-canonical Wnt signaling pathway		4	-0,7927105	-1,5027367	0,044715445	0,958918
BED	NEUROPROTECTION_INHIBITION		87	-0,30441925	-1,3478522	0,04496788	0,6912486
GOPROCESS	phospholipid transport		17	-0,5129783	-1,5295045	0,045081966	0,96798825
GOPROCESS	regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process		9	-0,6535703	-1,6066164	0,045161292	0,97741556
GOFUNCTION	aryl hydrocarbon receptor activity		2	-0,91793305	-1,4106052	0,04517454	0,9297459
GOPROCESS	bicarbonate transport		25	-0,43269968	-1,4525477	0,045360826	0,9111889
GOPROCESS	actin filament capping		11	-0,60663265	-1,5992874	0,045454547	0,923971
GOPROCESS	fatty acid elongation, monounsaturated fatty acid		2	-0,90591955	-1,3930018	0,045725647	0,93245274
GOPROCESS	sphingomyelin catabolic process		4	-0,7883696	-1,4960785	0,046025105	0,9485838
GOPROCESS	protein localization to ciliary transition zone		4	-0,7991394	-1,5602807	0,046092186	0,88288647
GOPROCESS	high-density lipoprotein particle remodeling		9	-0,63904864	-1,5576141	0,046121594	0,88470334
GOFUNCTION	laminin binding		21	-0,4694529	-1,4692793	0,046413504	0,9893007
GOFUNCTION	glucocorticoid receptor binding		12	-0,57734674	-1,578976	0,04661017	0,90669215
GOFUNCTION	death receptor binding		14	-0,5625896	-1,5698881	0,04710921	0,80701095
GOPROCESS	positive regulation of synaptic plasticity		8	-0,649813	-1,5739583	0,047325104	0,90668577
KEGG	04514_CELL ADHESION MOLECULES (CAMS)		70	-0,33674288	-1,4078324	0,04761905	1

GOPROCESS	interleukin-1 beta production	2	-0,90694964	-1,405764	0,047904193	0,92056906
GOPROCESS	negative regulation of interleukin-1 production	2	-0,89119816	-1,395329	0,04819277	0,931686
GOPROCESS	negative regulation of T cell differentiation in thymus	2	-0,89331293	-1,3624038	0,04821803	0,9213239
GOPROCESS	iron incorporation into metallo-sulfur cluster	2	-0,9175235	-1,4190445	0,048387095	0,8849651
GOPROCESS	calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitter	16	-0,51691914	-1,516868	0,04845815	0,973009
GOPROCESS	N-terminal protein myristoylation	3	-0,8440625	-1,4655423	0,048780486	0,92211527
GOLOCATION	mitochondrial respiratory chain complex IV	9	-0,62769866	-1,5582883	0,048780486	1
GOFUNCTION	Y-form DNA binding	4	-0,7910646	-1,5199041	0,048828125	0,89909524
GOPROCESS	protein localization to lysosome	8	-0,6654044	-1,6054145	0,048879836	0,9427375
GOPROCESS	negative regulation of cell size	11	-0,59151924	-1,5265738	0,04893617	0,95889825
KEGG	00563_GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL(GPI)-ANCHOR BIOSYNTHESIS	22	-0,47402796	-1,5277997	0,04897959	1
GOPROCESS	multicellular organismal iron ion homeostasis	6	-0,70083845	-1,5360893	0,04899777	0,9746359
GOFUNCTION	coproporphyrinogen oxidase activity	2	-0,88587475	-1,3766471	0,04901961	0,8795299
GOPROCESS	response to metal ion	7	-0,6729119	-1,5778865	0,04904051	0,9194651
SMPDB	[SMP00020]ARGININE AND PROLINE METABOLISM	16	-0,5130099	-1,5005866	0,04904051	0,7214892
BEDMOTIVE	CHEMOTAXIS	6	-0,732981	-1,568298	0,049079753	0,68861455
GOPROCESS	multicellular organism growth	65	-0,32812363	-1,3781683	0,049079753	0,93116874
GOLOCATION	nucleosome	29	-0,43552998	-1,5014445	0,049281314	1
BEDMOTIVE	LOW TASTE BUD FORMATION AND MAINTENANCE	6	-0,7083263	-1,5415772	0,049586777	0,7539903
GOFUNCTION	steroid hormone receptor activity	43	-0,38904342	-1,4410958	0,049586777	0,91366327
GOPROCESS	regulation of cytokine production	9	-0,6342779	-1,5617152	0,049586777	0,881636
SMPDB	[SMP00027]PANTOTHENATE AND COA BIOSYNTHESIS	4	-0,7828702	-1,4856051	0,049586777	0,68647736
GOPROCESS	peptidyl-lysine N6-acetylation	2	-0,90563697	-1,3882487	0,049618322	0,92438024
KEGG	00770_PANTOTHENATE AND COA BIOSYNTHESIS	10	-0,63289857	-1,6393955	0,04978355	1
GOPROCESS	positive regulation of PERK-mediated unfolded protein response	3	-0,8421855	-1,4833045	0,049792532	0,922173
TRRUST	APEX1	5	-0,73632383	-1,5346308	0,049792532	0,8891029
GOPROCESS	cardiac muscle tissue development	12	-0,5739417	-1,5644352	0,04989605	0,90776455

SOURCE	NAME	SIZE	ES	NES	p-value	FDR q-val
BEDPATH	DESMOSOME ADHESION OF ORAL AND ESOPHAGEAL MUCOSA-NON-KERATINIZED CELLS	15	0,66023356	1,8886012	0	0,09584961
BEDPATH	PROSTATE LUMINAL CELL DESMOSOME ADHESION	17	0,6474536	1,8808415	0	0,07238921
BEDPATH	BONE FORMATION	35	0,52454114	1,880159	0	0,05506042
BEDMOTIVE	ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS	8	0,8228012	2,002852	0	0,13293077
BEDMOTIVE	INCREASED EXPRESSION OF GROWTH FACTORS_ DIABETIC NEPHROPATHY	5	0,9153406	1,8586798	0	0,46482354
GOFUNCTIONIE	glycoprotein binding	44	0,45460314	1,6986294	0	1
GOFUNCTIONIE	RNA binding	1244	0,26014572	1,51042	0	1
GOPROCESS	positive regulation of DNA-directed DNA polymerase activity	5	0,940014	1,9055942	0	0,98262036
GOPROCESS	peptide metabolic process	9	0,73759425	1,8386769	0	0,92958933
GOPROCESS	DNA replication	135	0,39311352	1,8082024	0	0,94094557
GOPROCESS	DNA damage induced protein phosphorylation	6	0,8396075	1,8013405	0	0,7919456
GOPROCESS	translation	155	0,36829236	1,7299287	0	0,5969723
GOPROCESS	negative regulation of T cell differentiation	3	0,9109053	1,5634854	0	0,8501433
GOLOCATION	membrane coat	9	0,8671889	2,0618482	0	0,038677007
GOLOCATION	Ctf18 RFC-like complex	6	0,84474784	1,8171656	0	0,36217102
GOLOCATION	pre-snoRNP complex	6	0,838234	1,7648753	0	0,3252109
GOLOCATION	nucleolus	719	0,25458547	1,4195931	0	0,7988634
BEDMOTIVE	TISSUE INVASION AND METASTASIS_ CCRCC	38	0,49644053	1,7786115	0,001792115	0,7252657
GOPROCESS	protein monoubiquitination	28	0,523875	1,7670879	0,001872659	0,65325147
GOFUNCTIONIE	voltage-gated proton channel activity	2	0,985445	1,5236472	0,001930502	1
GOFUNCTIONIE	type I interferon binding	2	0,9719385	1,4844925	0,001934236	1
GOPROCESS	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 signaling pathway	2	0,9769561	1,5037043	0,001937985	0,8821814
GOLOCATION	gap junction	12	0,6961492	1,8513461	0,001937985	0,36177248
GOPROCESS	limb morphogenesis	8	0,8323053	1,9609401	0,001941748	0,9400051
BEDPATH	DESMOSOME ADHESION OF ORAL AND ESOPHAGEAL MUCOSA-KERATINIZED CELLS	17	0,6546551	1,9446605	0,001960784	0,10423973
GOFUNCTIONIE	tachykinin receptor activity	2	0,97006947	1,4734907	0,001964637	0,9769644
GOPROCESS	astrocyte activation	3	0,9541542	1,6509064	0,001968504	0,76453114
GOLOCATION	insulin-like growth factor ternary complex	4	0,8840339	1,6584797	0,001996008	0,5925837
GOPROCESS	negative regulation of transcription of nuclear large rRNA transcript from RNA polymerase I promoter	2	0,98210865	1,4835743	0,002008032	0,87497705
GOPROCESS	response to insulin-like growth factor stimulus	3	0,9370481	1,5951103	0,002016129	0,7606458
GOPROCESS	tachykinin receptor signaling pathway	5	0,8734465	1,783665	0,002061856	0,57927483
GOLOCATION	mitotic spindle midzone	8	0,7646568	1,7827939	0,003752345	0,32343495
GOLOCATION	histone pre-mRNA 3end processing complex	6	0,8271093	1,7991266	0,003787879	0,33361498
GOLOCATION	spliceosomal complex	84	0,383673	1,6352469	0,003802281	0,6673721
GOPROCESS	positive regulation of innate immune response	11	0,7039132	1,8546566	0,003809524	0,9375289
GOPROCESS	positive regulation of protein targeting to membrane	23	0,5316241	1,7348516	0,003816794	0,5894377
GOPROCESS	myeloid cell differentiation	18	0,59592474	1,798249	0,003831418	0,67099464
GOPROCESS	hematopoietic stem cell homeostasis	6	0,86141366	1,855946	0,003838772	1
GOPROCESS	spliceosomal snRNP assembly	25	0,51787204	1,697903	0,00390625	0,65800256
BEDMOTIVE	CRYPT CELL DIFFERENTIATION IMPAIRMENT	4	0,8831552	1,666457	0,003944773	1
GOLOCATION	nuclear lumen	2	0,97425795	1,4886281	0,003944773	0,67212504

TRRUST	BRIP1	2	0,97112226	1,4903948	0,003968254	0,70446455
GOPROCESS	positive regulation of ubiquitin-dependent endocytosis	2	0,98067534	1,4839578	0,004016064	0,8887207
GOPROCESS	dosage compensation	2	0,98210865	1,4892182	0,004065041	0,8776856
GOPROCESS	positive regulation of viral release from host cell	9	0,7440733	1,7866939	0,004166667	0,59729594
GOFUNCTIONI	peptide	3	0,9305204	1,6132922	0,004210526	0,81740177
GOPROCESS	binding of sperm to zona pellucida	23	0,5500168	1,7891273	0,005504587	0,62674063
GOPROCESS	viral budding via host ESCRT complex	18	0,6007859	1,8072314	0,005597015	0,8336232
GOFUNCTIONI	type I interferon receptor activity	2	0,9719385	1,5044758	0,005607477	1
GOPROCESS	positive regulation of vasoconstriction	21	0,57387227	1,789289	0,005617978	0,67777187
GOPROCESS	positive regulation of T cell migration	7	0,7672169	1,7372497	0,005736138	0,598703
GOPROCESS	regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	2	0,96152455	1,4806074	0,005747126	0,85957247
GOLOCATION	contractile ring	5	0,84435546	1,7423899	0,005836576	0,3607863
GOPROCESS	exit from mitosis	11	0,70327204	1,8265302	0,00591716	0,8933724
GOPROCESS	glycogen catabolic process	14	0,61673945	1,7519784	0,00591716	0,68086624
GOPROCESS	positive regulation of cap-independent translational initiation	3	0,94864106	1,6375456	0,005976096	0,7951529
GOPROCESS	myotome development	3	0,93881273	1,6217222	0,006012024	0,8046134
GOPROCESS	positive regulation of mitotic cytokinetic process	2	0,97535366	1,5067729	0,006012024	0,8861665
GOFUNCTIONI	tRNA (guanine-N2)-methyltransferase activity	3	0,89432615	1,5594968	0,006147541	0,99205863
GOFUNCTIONI	lysine N-methyltransferase activity	3	0,93276644	1,5889552	0,006160164	0,9028207
GOPROCESS	operant conditioning	2	0,97006947	1,4685283	0,006302521	0,89044964
GOFUNCTIONI	serine-type endopeptidase activity	92	0,38159183	1,6857507	0,00754717	0,9300469
GOFUNCTIONI	Notch binding	13	0,66290224	1,8285612	0,0078125	1
GOPROCESS	tryptophan catabolic process	8	0,7224326	1,7506901	0,007920792	0,654007
GOFUNCTIONI	interleukin-6 receptor binding	4	0,8861346	1,6616396	0,008080808	0,6943214
GOPROCESS	glucuronate catabolic process to xylulose 5-phosphate	4	0,9247682	1,7416741	0,008179959	0,6213875
GOFUNCTIONI	peptide binding	49	0,42552826	1,6295644	0,009140768	0,8066118
GOPROCESS	regulation of mitotic nuclear division	23	0,49360064	1,5977492	0,009416196	0,8081971
GOFUNCTIONI	tropomyosin binding	8	0,74030364	1,7181964	0,009469697	1
GOPROCESS	vir life cycle	26	0,52546173	1,742784	0,009469697	0,64306843
GOFUNCTIONI	RNA-DNA hybrid ribonuclease activity	5	0,8084072	1,6712826	0,009487666	0,7522619
GOFUNCTIONI	MAP kinase kinase kinase activity	15	0,59744173	1,6775949	0,009615385	0,78383416
GOPROCESS	response to UV-A	3	0,9217381	1,5956508	0,009615385	0,7673338
BEDMOTIVE	OXIDATIVE STRESS_HEART_FAILURE	4	0,8548917	1,6285703	0,009652509	1
GOFUNCTIONI	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	8	0,7341187	1,7777702	0,009652509	1
GOPROCESS	exocrine pancreas development	4	0,8341698	1,576429	0,00967118	0,7887399
GOPROCESS	T cell mediated immunity	8	0,74626833	1,7666668	0,009689922	0,61797976
GOPROCESS	nerve growth factor processing	4	0,83075845	1,5988396	0,009708738	0,8240624
GOLOCATION	spindle midzone	17	0,5780832	1,7206322	0,009727626	0,39821756
GOFUNCTIONI	omega peptidase activity	3	0,90418845	1,578795	0,009803922	0,8856608
BEDPATH	DESMOSOME	18	0,5879657	1,812789	0,009881423	0,092932925
GOPROCESS	ovulation cycle	6	0,7953271	1,6693299	0,01	0,73906446
GOPROCESS	response to hydroxyisoflavone	2	0,975992	1,4601669	0,01010101	0,88876295

BEDPATH	ASTROCYTE GLYCOGENESIS	6	0,78477544	1,7101485	0,010204081	0,21089645
GOFUNCTION	epidermal growth factor-activated receptor activity	2	0,957169	1,4611316	0,010204081	0,91705275
GOPROCESS	protein acetylation	10	0,7221767	1,801205	0,011257036	0,71438533
GOPROCESS	regulation of viral process	4	0,8455478	1,5994458	0,011278195	0,8319736
GOPROCESS	multivesicular body assembly	28	0,48608997	1,6197118	0,011363637	0,80560607
GOPROCESS	negative regulation of histone phosphorylation	3	0,92037004	1,5977726	0,011428571	0,81992644
GOPROCESS	tongue development	9	0,7134582	1,7176771	0,011450382	0,6330336
GOPROCESS	positive regulation of T cell apoptotic process	3	0,9069428	1,5226582	0,011516315	0,9148129
GOFUNCTION	phospholipase inhibitor activity	4	0,86114377	1,6301588	0,011560693	0,86391175
GOPROCESS	valine catabolic process	3	0,91102684	1,5502002	0,011560693	0,8996725
GOFUNCTION	S100 protein binding	12	0,62024325	1,6892741	0,011583012	1
GOPROCESS	positive regulation of chemokine production	9	0,69467777	1,7474362	0,011695907	0,6429777
GOPROCESS	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	2	0,95012033	1,462461	0,011857707	0,9006169
GOPROCESS	regulation of centrosome duplication	16	0,602773	1,7404673	0,011976048	0,6033862
GOPROCESS	nuclear envelope reassembly	7	0,7306471	1,6595584	0,012048192	0,7214895
TRRUST	ZMYND11	3	0,899577	1,5610175	0,012145749	0,62073606
GOFUNCTION	benzodiazepine receptor binding	2	0,9570861	1,4703053	0,012295082	0,919442
GOPROCESS	regulation of cellular response to heat	74	0,36885136	1,5418103	0,012389381	0,9047144
GOPROCESS	positive regulation of cardioblast differentiation	4	0,8507603	1,5777022	0,012474013	0,79892856
GOPROCESS	midgut development	5	0,8045368	1,6710174	0,013133208	0,7463964
GOPROCESS	regulation of mitotic spindle assembly	13	0,6289849	1,7163602	0,013232514	0,61956865
TRRUST	FLI1	19	0,54538274	1,6730822	0,013232514	1
GOPROCESS	eye development	28	0,46532696	1,5959896	0,013435701	0,7863719
BEDPATH	GLYCOGENOLYSIS	6	0,75645673	1,6307446	0,013461539	0,28691843
GOPROCESS	7-methylguanosine mRNA capping	31	0,4870037	1,7123346	0,013513514	0,62365407
GOPROCESS	mitochondrial translational initiation	2	0,9520954	1,4440444	0,013645224	0,9456586
GOPROCESS	meiotic telomere clustering	4	0,8551755	1,5956706	0,013916501	0,77764916
GOPROCESS	cerebral cortex cell migration	5	0,82285064	1,6733558	0,014	0,7693221
GOPROCESS	trigeminal ganglion development	4	0,85200447	1,6008394	0,01417004	0,8470556
GOPROCESS	protein polymerization	9	0,6885572	1,7255031	0,014545455	0,60438967
GOPROCESS	negative regulation of interleukin-1-mediated signaling pathway	2	0,93480635	1,4140722	0,014553014	0,9448046
GOFUNCTION	4 iron, 4 sulfur cluster binding	37	0,4527847	1,6255039	0,01459854	0,78187275
GOFUNCTION	SUMO binding	11	0,6526034	1,6864561	0,015296367	1
BEDMOTIVE	SODIUM AND WATER RETENTION	48	0,38789514	1,4894168	0,015564202	1
BEDMOTIVE	CELL GROWTH AND PROLIFERATION_UTERINE_CERVICAL_NEOPLASMS	22	0,54033345	1,7117534	0,015717093	1
GOPROCESS	folic acid-containing compound biosynthetic process	2	0,94399476	1,4754578	0,015873017	0,8812491
GOPROCESS	negative regulation of PERK-mediated unfolded protein response	5	0,8158599	1,6607809	0,015968064	0,72928596
BEDPATH	PNEUMOCYTE TII DESMOSOME	19	0,5482009	1,6594727	0,016161617	0,2512216
GOPROCESS	adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	5	0,78246546	1,602305	0,016359918	0,85011125
GOFUNCTION	Tat protein binding	9	0,67354816	1,6838964	0,016483517	0,828342
GOPROCESS	translational initiation	115	0,32118565	1,4418564	0,016574586	0,93869096
GOLOCATION	endocytic vesicle	40	0,43408507	1,5671777	0,016574586	0,60838026

BEDMOTIVE	IMBALANCE BETWEEN BONE FORMATION AND RESORPTION	23	0,52998626	1,6498479	0,016981132	1
GOPROCESS	N-terminal peptidyl-lysine acetylation	3	0,8799036	1,5099967	0,017142856	0,90309626
GOPROCESS	negative regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	13	0,60480726	1,6754065	0,017208412	0,7741508
GOFUNCTIONIE	epinephrine binding	2	0,93860227	1,4154242	0,017374517	0,99866384
GOPROCESS	hydrogen peroxide metabolic process	5	0,8047135	1,6660712	0,017509727	0,7435647
GOPROCESS	steroid catabolic process	2	0,93108517	1,4240931	0,017509727	0,95797193
GOPROCESS	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	114	0,32802254	1,4716067	0,017825311	0,88312477
GOPROCESS	positive regulation of synaptic transmission, glutamatergic	13	0,5838434	1,6351807	0,018214935	0,7650024
GOFUNCTIONIE	copper-dependent protein binding	3	0,86843646	1,518169	0,018255578	1
GOPROCESS	ESCRT III complex disassembly	10	0,6438279	1,6310202	0,018348623	0,76600254
GOPROCESS	establishment of protein localization	33	0,4868581	1,6784011	0,018382354	0,7734553
GOLOCATION	sex chromatin	6	0,75419915	1,6348543	0,0186722	0,61460966
GOLOCATION	SMN-5m protein complex	14	0,6134279	1,6629823	0,018726591	0,6308497
GOPROCESS	cell growth	48	0,38504902	1,4928168	0,018832391	0,9043263
GOPROCESS	chemotaxis	60	0,38808587	1,5268689	0,018867925	0,9250645
GOFUNCTIONIE	axon guidance receptor activity	3	0,89410734	1,5213808	0,018939395	1
GOPROCESS	generation of neurons	7	0,72954684	1,645302	0,018975332	0,7719124
GOPROCESS	regulation of translational initiation by eIF2 alpha dephosphorylation	2	0,9407215	1,4250685	0,01923077	0,9631323
BEDMOTIVE	ABNORMAL NEURONAL CONTROL_VASODILATION	2	0,9301466	1,3956445	0,019607844	0,98149043
GOFUNCTIONIE	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity	2	0,9469222	1,4090409	0,02020202	0,9517478
BED	OSTEOPOROSIS	42	0,42169538	1,5653032	0,020220589	1
GOPROCESS	meiotic mismatch repair	2	0,94470197	1,43639	0,020283977	0,95250773
GOPROCESS	protection from non-homologous end joining at telomere	7	0,73336697	1,7009392	0,020446097	0,6582351
BED	HYPOGLYCEMIA	20	0,517878	1,6087228	0,020560747	1
BEDMOTIVE	REDUCED GLUCOSE OUTPUT	11	0,64657927	1,6537468	0,020560747	1
GOFUNCTIONIE	RNA polymerase II transcription cofactor activity	31	0,46428195	1,6018789	0,020637898	0,8517298
GOPROCESS	positive regulation of type I interferon production	45	0,4068218	1,5472181	0,020992367	0,9119183
GOFUNCTIONIE	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase activity	2	0,9278333	1,437814	0,021194605	1
GOPROCESS	magnesium ion homeostasis	4	0,8169422	1,5440955	0,021235522	0,91502655
TRRUST	PML	16	0,5734083	1,6375813	0,02131783	1
GOLOCATION	membrane	1631	0,19676049	1,1562911	0,021341464	1
GOPROCESS	viral transcription	107	0,31897968	1,4151102	0,021390375	0,9488311
GOPROCESS	positive regulation of neuron migration	8	0,67751426	1,6058547	0,021526419	0,8794304
GOLOCATION	connexin complex	15	0,5622532	1,6025934	0,021568628	0,76371634
GOPROCESS	regulation of sensory perception of pain	11	0,65239364	1,702157	0,021778584	0,67168105
GOPROCESS	membrane invagination	6	0,7519053	1,6273209	0,021825397	0,7781304
GOPROCESS	right ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis	2	0,9329833	1,4320279	0,022	0,9668753
BEDMOTIVE	COMPROMISED SKIN BARRIER FUNCTION	6	0,71685284	1,5540416	0,022177419	1
GOLOCATION	MCM complex	6	0,7571425	1,5992279	0,022181146	0,6820766
GOPROCESS	nuclear import	16	0,5517637	1,6053207	0,022312373	0,86889684
GOPROCESS	negative regulation of vascular smooth muscle contraction	3	0,8685471	1,4986763	0,02264151	0,8931722
GOFUNCTIONIE	histone pre-mRNA stem-loop binding	2	0,93232703	1,4234546	0,022727273	1

GOPROCESS	regulation of retinoic acid receptor signaling pathway	2	0,9322541	1,4448705	0,022727273	0,9627977
GOLOCATION	MIS12/MIND type complex	4	0,8196176	1,5532286	0,022900764	0,57438695
TRRUST	E2F4	22	0,5110587	1,5974513	0,02292769	1
GOPROCESS	psychomotor behavior	2	0,93837965	1,4244579	0,02296451	0,95934534
SMPDB	[SMP00555]GLYCOGENOSIS, TYPE VI. HERS DISEASE	12	0,6047539	1,6163306	0,023391813	1
TRRUST	TSG101	3	0,8717922	1,5076636	0,0234375	0,7179799
GOPROCESS	fungiform papilla morphogenesis	2	0,9387443	1,4173735	0,024193548	0,95124733
GOPROCESS	positive regulation of cytokine-mediated signaling pathway	7	0,71842396	1,6049731	0,024242423	0,8575633
BEDPATH	ENDOTHELIAL CELL LACTATE PRODUCTION	3	0,86515707	1,5419308	0,024340771	0,39502448
SMPDB	[SMP00556]MUCOPOLYSACCHARIDOSIS VI. SLY SYNDROME	12	0,6047539	1,6129539	0,024482109	1
GOPROCESS	response to osmotic stress	14	0,6058617	1,6638924	0,025145067	0,7239818
GOLOCATION	cyclin E2-CDK2 complex	2	0,9325384	1,4085717	0,0251938	0,83334893
GOLOCATION	condensed nuclear chromosome	25	0,4730287	1,5671657	0,025242718	0,58197397
GOPROCESS	response to antipsychotic drug	2	0,93822944	1,4446948	0,025316456	0,9594328
SMPDB	[SMP00552]GLYCOGEN SYNTHETASE DEFICIENCY	12	0,6047539	1,6092283	0,025390625	1
GOLOCATION	ESCRT III complex	9	0,6529692	1,5944616	0,025440313	0,6666653
GOFUNCTIONI	DNA replication origin binding	13	0,60245204	1,6628662	0,025540275	0,74733955
SMPDB	[SMP00058]STARCH AND SUCROSE METABOLISM	12	0,6047539	1,6059209	0,02559415	1
GOPROCESS	positive regulation of T-helper 1 cell differentiation	4	0,8119302	1,5412251	0,025735294	0,8996966
GOLOCATION	chromosome passenger complex	3	0,87835413	1,5087552	0,025925925	0,66157305
GOPROCESS	response to cobalamin	2	0,92882633	1,4532712	0,026	0,9289543
GOPROCESS	cellular response to BMP stimulus	18	0,5520434	1,671096	0,02631579	0,7658702
GOPROCESS	vacuolar transport	7	0,7187167	1,6338097	0,02631579	0,7606505
GOFUNCTIONI	ribonuclease activity	10	0,6249779	1,5823907	0,026415095	0,9054392
GOFUNCTIONI	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase activity	2	0,9278333	1,4073704	0,026476579	0,95127344
GOPROCESS	positive regulation of uterine smooth muscle contraction	5	0,77042645	1,5812925	0,026476579	0,8142042
GOPROCESS	xenobiotic transport	2	0,9192885	1,4415034	0,026490066	0,9369877
GOPROCESS	mRNA catabolic process	14	0,59140617	1,6646446	0,026565464	0,7359296
BEDPATH	UROTHELIUM DIFFERENTIATION	11	0,6261228	1,6644132	0,026666667	0,2749876
GOPROCESS	nucleus organization	17	0,54247564	1,6405064	0,026717557	0,7891911
GOPROCESS	chaperone-mediated protein complex assembly	11	0,60817105	1,5828681	0,027027028	0,8136308
GOFUNCTIONI	inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase activity	2	0,9278333	1,4150474	0,027079303	0,9872794
GOPROCESS	DNA replication, removal of RNA primer	3	0,8762498	1,5346152	0,027131783	0,90298706
GOPROCESS	positive regulation of ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity	2	0,9174506	1,4130841	0,027237354	0,9480384
GOPROCESS	positive regulation of cytokine production	13	0,5735541	1,6192071	0,02739726	0,79531693
GOPROCESS	positive regulation of homotypic cell-cell adhesion	2	0,9192737	1,4230189	0,027833002	0,953981
GOFUNCTIONI	exopeptidase activity	2	0,92554516	1,4138744	0,027944112	0,9688981
SMPDB	[SMP00557]SUCRASE-ISOMALTASE DEFICIENCY	12	0,6047539	1,5757384	0,028142588	1
GOFUNCTIONI	protein-L-isaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity	3	0,8421648	1,4770346	0,028225806	0,9669958
BEDPATH	CLARA CELL DIFFERENTIATION	6	0,74198675	1,6187689	0,028571429	0,28544393
GOFUNCTIONI	peptide transporter activity	2	0,92150515	1,437458	0,029069768	0,9986134
GOPROCESS	endoplasmic reticulum unfolded protein response	34	0,44685668	1,5398722	0,029069768	0,89165044

GOLOCATION	nuclear body	238	0,26468387	1,315063	0,02919708	0,87938446
GOPROCESS	regulation of mitotic cell cycle phase transition	7	0,6869348	1,5643529	0,029357798	0,8535323
GOPROCESS	regulation of JNK cascade	15	0,5796222	1,6374664	0,02962963	0,7797868
GOFUNCTION	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase activity	2	0,9245673	1,4232384	0,029821074	1
GOPROCESS	cytoplasmic translation	16	0,56820375	1,6360201	0,029880479	0,7741944
GOLOCATION	Lewy body core	3	0,87036717	1,4795607	0,03	0,68588865
GOFUNCTION	peptide N-acetyltransferase activity	2	0,9155545	1,3961443	0,030245747	0,9713238
PHARMKB	[PA2027]GLUCOCORTICOID PATHWAY (PERIPHERAL TISSUE), PHARMABEDPATHYNAMICS	8	0,67943394	1,6140326	0,030360531	1
SMPDB	[SMP00553]GLYCOGENOSIS, TYPE III. CORI DISEASE, DEBRANCHER GLYCOGENOSIS	12	0,6047539	1,6300074	0,03046595	1
BEDMOTIVE	CELL GROWTH AND PROLIFERATION. GLIOBLASTOMA	25	0,4845439	1,5547984	0,03047619	1
GOPROCESS	epidermal growth factor-activated receptor transactivation by G-protein coupled receptor signaling pathway	2	0,9204736	1,423469	0,03047619	0,95852923
TRRUST	MYCN	38	0,43567654	1,5738144	0,03065134	0,7163458
GOPROCESS	myeloid dendritic cell activation	2	0,92551464	1,4116219	0,030864198	0,9437435
GOLOCATION	DNA-directed RNA polymerase III complex	16	0,540537	1,578351	0,031620555	0,6756968
GOLOCATION	tertiary granule lumen	36	0,41691738	1,4919022	0,03180212	0,672205
BEDPATH	DISRUPTING CHIEF CELL DIFFERENTIATION STATUS	2	0,93604606	1,4117349	0,031809144	0,5447915
GOPROCESS	positive regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	6	0,7463609	1,5997155	0,032319393	0,8425182
GOPROCESS	positive regulation of ureteric bud formation	3	0,85307723	1,4870075	0,032520324	0,8827379
GOPROCESS	cytosine metabolic process	2	0,916835	1,406231	0,032520324	0,94233507
GOPROCESS	negative regulation of Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	2	0,92034006	1,4380188	0,032719836	0,9445538
GOPROCESS	sarcoplasmic reticulum calcium ion transport	3	0,849304	1,4974039	0,03275109	0,89595264
GOPROCESS	regulation of mitotic cell cycle	33	0,44017625	1,53251	0,032882012	0,90946376
GOPROCESS	protein hexamerization	8	0,6655969	1,5975477	0,032945737	0,79819363
GOPROCESS	myoblast migration	8	0,6674833	1,5688738	0,032945737	0,83091706
GOLOCATION	SMN complex	8	0,6627307	1,5685115	0,0331384	0,6283281
TRRUST	HDAC7	12	0,5876535	1,5808597	0,03314917	0,94127554
GOPROCESS	chromosome segregation	53	0,39210862	1,5200081	0,033203125	0,9029067
GOPROCESS	rRNA processing	196	0,26920402	1,3138299	0,03362832	1
GOPROCESS	response to auditory stimulus	8	0,6808401	1,6037079	0,033663366	0,8531647
GOLOCATION	cell	16	0,53590584	1,5751389	0,033707865	0,6571406
GOPROCESS	cell morphogenesis	38	0,42552704	1,5293754	0,033771105	0,9147553
GOPROCESS	positive regulation by virus of viral protein levels in host cell	4	0,8017407	1,5017601	0,033962265	0,883132
GOLOCATION	cytosolic large ribosomal subunit	55	0,36853334	1,4408225	0,033989266	0,711156
GOLOCATION	core TFIIH complex	5	0,758214	1,5189954	0,034	0,67342675
GOPROCESS	learning or memory	29	0,4570344	1,5432682	0,034026466	0,9118326
GOFUNCTION	magnesium ion binding	163	0,28138432	1,3368901	0,034234233	0,963949
GOPROCESS	regulation of double-strand break repair	2	0,93292135	1,3920794	0,034274194	0,93332696
BEDPATH	CENTRAL MEMORY T (TCM) PROFILE	9	0,6412169	1,5787839	0,034358047	0,3238573
GOPROCESS	positive regulation of synaptic transmission, cholinergic	3	0,8578312	1,4836984	0,034416825	0,8850224
GOPROCESS	positive regulation of NIK/NF-kappaB signaling	18	0,5160122	1,545862	0,034836065	0,91181386
GOPROCESS	antigen processing and presentation of endogenous antigen	2	0,92117834	1,4002875	0,03508772	0,94558716
GOPROCESS	protein localization to endoplasmic reticulum	5	0,7824216	1,5429534	0,03522505	0,90510106

TRRUST	HOXC6	2	0,9341769	1,4214467	0,03557312	0,87601316
GOLOCATION	mitotic spindle pole	11	0,61837596	1,599645	0,035587188	0,7270334
GOPROCESS	tRNA modification	28	0,45799094	1,5352234	0,035643563	0,9160898
GOPROCESS	regulation of autophagy	39	0,41871962	1,5182348	0,035714287	0,908427
TRRUST	BCL3	5	0,7556075	1,5616938	0,036121674	0,6942003
GOPROCESS	regulation of mitotic centrosome separation	4	0,78046775	1,4908462	0,036144577	0,9005431
GOPROCESS	aspartate catabolic process	2	0,9128564	1,3952436	0,036217302	0,9374535
GOLOCATION	HFE-transferrin receptor complex	6	0,7239419	1,5615184	0,036217302	0,5577183
GOFUNCTION	histone methyltransferase binding	6	0,704963	1,5232064	0,03632887	1
GOPROCESS	positive regulation of toll-like receptor 3 signaling pathway	7	0,6902329	1,5783578	0,036511157	0,8044393
GOPROCESS	glutamate catabolic process to 2-oxoglutarate	2	0,9128564	1,4121796	0,036538463	0,9434896
TRRUST	NFKB2	5	0,7738721	1,5550914	0,036659878	0,58748144
BEDPATH	MYELOID DENDRITIC CELL ENDOCYTOSIS	82	0,31472933	1,3622491	0,036679536	0,54886544
BEDMOTIVE	ADHESION TO THE ENDOMETRIAL EPITHELIUM	9	0,65131366	1,590169	0,036821704	1
GOLOCATION	Gemini of coiled bodies	8	0,6716459	1,5915527	0,036900368	0,6412472
GOPROCESS	motor neuron axon guidance	15	0,5315145	1,5167763	0,037037037	0,9041515
GOPROCESS	negative regulation of striated muscle contraction	2	0,92479366	1,4110879	0,037109375	0,9438755
GOLOCATION	site of double-strand break	27	0,4533388	1,5135003	0,03717472	0,67833906
GOPROCESS	double-strand break repair involved in meiotic recombination	2	0,9267404	1,3999933	0,037401576	0,94098127
GOPROCESS	mitotic recombination	10	0,65139997	1,6488409	0,037906136	0,7622708
GOPROCESS	negative regulation of ERBB signaling pathway	10	0,62706023	1,5974083	0,03807615	0,7878689
BEDMOTIVE	HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC SKIN LAYER-STRETCH_MARKS	4	0,7688	1,4819824	0,03809524	1
GOPROCESS	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to hydrogen peroxide	2	0,926566	1,4078841	0,03815261	0,9447643
GOLOCATION	nucleoplasm	2634	0,18656415	1,1161077	0,038235296	1
GOFUNCTION	transcription factor activity, RNA polymerase III transcription factor binding	2	0,91168964	1,3881205	0,038240917	0,94886833
GOFUNCTION	monovalent cation	2	0,92077523	1,4367669	0,038306452	0,9871473
GOLOCATION	basolateral plasma membrane	125	0,30710462	1,402508	0,038391225	0,78513426
SMPDB	[SMP00554]GLYCOGENOSIS, TYPE IV. AMYLOPECTINOSIS, ANDERSON DISEASE	12	0,6047539	1,5830244	0,038535647	1
GOPROCESS	positive regulation of protein acetylation	5	0,7723933	1,5405998	0,03875969	0,895311
GOPROCESS	peroxisome membrane biogenesis	2	0,91256475	1,4399977	0,03877551	0,9389964
GOPROCESS	establishment or maintenance of cell polarity	24	0,4655235	1,516142	0,038817007	0,90141237
GOPROCESS	positive regulation of neurotrophin TRK receptor signaling pathway	5	0,76799715	1,525212	0,038910504	0,9205857
GOPROCESS	positive regulation of DNA replication	29	0,45531327	1,5150683	0,038910504	0,90183294
GOPROCESS	cellular response to fructose stimulus	3	0,8482351	1,4726833	0,039033458	0,8859343
GOPROCESS	proteoglycan biosynthetic process	10	0,6204352	1,5767568	0,03929273	0,7958
GOPROCESS	mRNA transcription	5	0,76401615	1,5202811	0,039399624	0,9087636
GOPROCESS	mRNA splicing, via spliceosome	228	0,2572113	1,2876016	0,039426524	1
GOLOCATION	dense body	5	0,7235606	1,4948952	0,039473683	0,67546785
GOPROCESS	positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity	2	0,9130507	1,4023604	0,03960396	0,9515148
GOPROCESS	mesenchymal cell differentiation	6	0,73812145	1,5935148	0,03976143	0,76108557
GOLOCATION	extracellular region	949	0,20652747	1,177799	0,039930556	0,9805651
GOPROCESS	transcription-coupled nucleotide-excision repair	70	0,33756027	1,3961563	0,040219378	0,9407035

TRRUST	EWSR1	7	0,69741756	1,5747368	0,0403071	0,8275797
KEGG	03013_RNA TRANSPORT	115	0,30375588	1,3630476	0,04042179	1
GOPROCESS	positive regulation of protein kinase C activity	4	0,77768403	1,4857762	0,040935673	0,8806948
GOPROCESS	positive regulation of superoxide anion generation	9	0,65376955	1,57856	0,040968344	0,8128787
GOFUNCTIONI	structural constituent of ribosome	146	0,28624222	1,3253443	0,040998217	0,95074534
GOPROCESS	peptidyl-L-cysteine S-palmitoylation	6	0,7301736	1,5530666	0,041121494	0,8876983
GOFUNCTIONI	inositol-1,3,4-trisphosphate 4-phosphatase activity	2	0,9278333	1,4137791	0,041152265	0,95631325
GOPROCESS	negative regulation of synaptic transmission, glutamatergic	4	0,78379107	1,4811924	0,04117647	0,8653634
GOPROCESS	glycyl-tRNA aminoacylation	2	0,9068038	1,3960189	0,04117647	0,93540066
GOPROCESS	replication-born double-strand break repair via sister chromatid exchange	2	0,9192008	1,4045341	0,041275796	0,947035
BEDMOTIVE	CELL GROWTH AND PROLIFERATION_SCLC	29	0,43970844	1,5026432	0,041666668	1
GOPROCESS	nephron tubule epithelial cell differentiation	2	0,91336924	1,4124254	0,04233871	0,94545066
GOPROCESS	protein glycosylation in endoplasmic reticulum	2	0,9083352	1,4179264	0,042424243	0,9548842
GOFUNCTIONI	SMAD binding	44	0,39010313	1,4793015	0,042513862	0,9972188
GOPROCESS	response to stress	41	0,39012653	1,4363197	0,042592593	0,94875747
TRRUST	NCOA3	7	0,67859054	1,5882525	0,04263566	1
GOLOCATION	aggresome	32	0,42109787	1,459304	0,042718448	0,68303865
GOPROCESS	alpha-tubulin acetylation	2	0,8991575	1,3828175	0,042769857	0,92607886
BEDMOTIVE	CELL GROWTH AND PROLIFERATION_CHONDROSARCOMA	10	0,646283	1,6241099	0,043137256	0,9736985
GOPROCESS	ATF6-mediated unfolded protein response	9	0,6363482	1,5797809	0,04330709	0,8145883
BEDPATH	COLUMNAR EPITHELIAL GLANDULAR ENDOCERVIX CELL DESMOSOME	20	0,5124741	1,5813773	0,0433145	0,34688196
GOPROCESS	synaptonemal complex assembly	11	0,6137207	1,5849953	0,043392505	0,8093548
GOPROCESS	RNA splicing, via transesterification reactions	25	0,46136254	1,5074022	0,04347826	0,901557
GOPROCESS	toll-like receptor 4 signaling pathway	9	0,643977	1,5594339	0,043650795	0,8599634
BEDMOTIVE	DECREASED WATER RENAL EXCRETION	15	0,5390642	1,5262831	0,043824703	1
GOPROCESS	small GTPase mediated signal transduction	104	0,3122015	1,3829933	0,043875687	0,9276258
GOLOCATION	CCR4-NOT complex	13	0,5762797	1,565946	0,04389313	0,5623941
GOPROCESS	multi-ciliated epithelial cell differentiation	3	0,8551634	1,4611727	0,044176705	0,904871
GOPROCESS	atrial septum morphogenesis	9	0,63115007	1,5581377	0,044354837	0,8599948
GOPROCESS	calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	22	0,48278433	1,5208987	0,044401545	0,9197239
TRRUST	ASCL1	6	0,7111634	1,5512424	0,04489796	0,55183053
GOPROCESS	aspartate biosynthetic process	2	0,9128564	1,3930205	0,044989776	0,9365679
GOFUNCTIONI	L-aspartate	2	0,9128564	1,363666	0,04509804	0,9733269
GOLOCATION	holo TFIIF complex	10	0,6114295	1,5336018	0,045454547	0,6470197
GOPROCESS	cobalamin transport	4	0,7849309	1,4779322	0,04563492	0,87324345
GOFUNCTIONI	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	121	0,29393068	1,3291329	0,04570384	0,98729855
GOLOCATION	cytoplasmic side of endoplasmic reticulum membrane	2	0,9009837	1,3970901	0,045714285	0,7524556
GOPROCESS	endochondral bone morphogenesis	3	0,8386508	1,45211	0,045908183	0,9277945
BEDMOTIVE	HYPERGLYCEMIA - RENAL FAILURE-	9	0,6160378	1,5061938	0,04597701	1
GOPROCESS	negative regulation of interleukin-2 production	5	0,7463895	1,4881574	0,04597701	0,8799105
GOPROCESS	negative regulation of chondrocyte proliferation	3	0,8447608	1,4859825	0,046092186	0,88457024
TRRUST	NR3C2	3	0,84122133	1,4697843	0,046692606	0,7700214

GOPROCESS	positive regulation of T cell differentiation	11	0,58273774	1,4894028	0,046846848	0,88199824
GOLOCATION	low-density lipoprotein particle	10	0,6225495	1,5745853	0,046875	0,62764037
GOFUNCTION	coreceptor activity involved in Wnt signaling pathway	2	0,912279	1,4071699	0,047227927	0,9406456
KEGG	04672_INTESTINAL IMMUNE NETWORK FOR IGA PRODUCTION	9	0,6333301	1,5416796	0,047244094	1
GOPROCESS	mRNA 5-splice site recognition	6	0,69223404	1,5205132	0,04725898	0,91482913
BEDMOTIVE	ABNORMAL BIOMECHANICAL LOADING OF THE HEART VALVES-MYXOMATOUS_MITRAL_VALVE_DISEASE_CANINE	9	0,6115058	1,5291967	0,04733728	1
GOPROCESS	RNA catabolic process	17	0,5259707	1,5071155	0,047445256	0,8968485
GOFUNCTION	translation regulator activity	5	0,72350603	1,4793656	0,047524754	1
GOPROCESS	G1/S transition of mitotic cell cycle	101	0,30359262	1,3513429	0,047531992	0,97503
GOPROCESS	olfactory plaBEDPAThe formation	3	0,8434319	1,4160937	0,047717843	0,9527654
BEDPATH	SQUAMOUS EPITHELIAL ECTOCERVIX BASAL CELL DESMOSOME	18	0,51543653	1,5407387	0,04789272	0,36952588
GOFUNCTION	glycine-tRNA ligase activity	2	0,9068038	1,3892479	0,047984645	0,9624711
GOPROCESS	positive regulation of prolactin secretion	2	0,9234168	1,4261849	0,047984645	0,9588858
GOPROCESS	neutrophil chemotaxis	22	0,4819131	1,5173815	0,04805915	0,9072253
GOPROCESS	negative regulation of chronic inflammatory response	4	0,79899347	1,5234764	0,0483559	0,92494625
KEGG	05203_VIRAL CARCINOGENESIS	6	0,7163219	1,5156516	0,0483559	0,7596458
KEGG	05416_VIRAL MYOCARDITIS	19	0,49847344	1,5300019	0,048507463	1
GOPROCESS	de novo CTP biosynthetic process	2	0,8998434	1,3785859	0,048681542	0,9330404
GOFUNCTION	histone pre-mRNA DCP binding	4	0,77998036	1,4502051	0,048828125	0,933155
GOFUNCTION	coreceptor activity involved in canonical Wnt signaling pathway	2	0,912279	1,3821175	0,04893617	0,9803486
GOLOCATION	condensed nuclear chromosome outer kinetochore	2	0,91382295	1,4079474	0,0491453	0,80817336
GOFUNCTION	mRNA 3-UTR binding	49	0,38080558	1,4646205	0,049541283	0,9456938
GOPROCESS	mitochondrial iron ion transport	2	0,89753217	1,3942959	0,049586777	0,94076055
GOPROCESS	positive regulation of ruffle assembly	8	0,6555068	1,5061841	0,04990758	0,88366896

Anexo 7 – Mutaciones predichas por CONDEL.

START	CHR	END	REF	ALT	Func.refGene	ExonicFunc.refGene	Gene.refGene	DESCRIPTION	gene_expression	sample	mutual_genes	ID	STRAND	TRANSCRIPT	PROTEIN	CONDEL	CONDEL_LABEL
1576064	16	1576064	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	IFT140	intraflagellar transport 140	262.527.048.937.469	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000361339	ENSP00000354895	0.522174242359	D
3707932	16	3707932	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	DNASE1	deoxyribonuclease 1	273.335.434.061.383	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000246949	ENSP00000246949	0.658204626014	D
11566198	17	11656198	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	DNAH9	dynein axonemal heavy chain 9	0.0285691521967709	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000262442	ENSP00000262442	0.532670323743	D
16237365	3	16237365	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	GALT1N5	polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 15	0.31034012061215	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000339732	ENSP00000344260	0.71529109523	D
22575477	19	22575477	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	ZNF98	zinc finger protein 98	0.20163386116965	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000357774	ENSP00000350418	0.76242249279	D
29591693	6	29591693	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	GABBR1	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	559.454.854.955.035	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000355973	ENSP00000348248	0.541976631008	D
35739620	14	35739620	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	KIAA0391		329.425.313.644.451	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000250377	ENSP00000250377	0.573362806816	D
37739707	14	37739707	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	MIPOL1	mirror-image polydactyly 1	0.0976107966264223	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000327441	ENSP00000335359	0.529089895531	D
39077974	19	39077974	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	RYR1	ryanodine receptor 1	109.085.343.045.111	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000355481	ENSP00000347667	0.600082302053	D
41259707	4	41259707	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1	852.790.701.366.271	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000284440	ENSP00000284440	0.67449217102	D
46130030	19	46130030	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	EML2	echinoderm microtubule associated protein like 2	391.552.090.075.196	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000245925	ENSP00000245925	0.684502604156	D
48691791	3	48691791	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	CELSR3	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	435.120.427.725.799	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000164024	ENSP00000164024	0.715710599503	D
89698750	15	89698750	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	ABHD2	abhydrolase domain containing 2	320.789.285.164.133	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000352732	ENSP00000268129	0.556085820847	D
90782097	8	90782097	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2	23.533.232.911.629	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000220751	ENSP00000220751	0.641731664891	D
91026630	15	91026630	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	370.929.063.572.336	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000268182	ENSP00000268182	0.69375177875	D
98750291	2	98750291	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	VWA3B	von Willebrand factor A domain containing 3B	0	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000435344	ENSP00000401959	0.538969129977	D
100366388	1	100366388	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	AGL	amylol-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	237.295.209.791.183	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000294724	ENSP00000294724	0.70374234383	D
101717832	8	101717832	G	C	exonic	nonsynonymous SNV	PABPC1	poly(A) binding protein cytoplasmic 1	843.721.109.028.656	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000318607	ENSP00000313007	0.668163554408	D
105779574	10	105779574	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	SLK	STE20 like kinase	326.903.314.645.524	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000335753	ENSP00000336824	0.525133749345	D
112237854	12	112237854	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	604.023.491.675.437	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000261733	ENSP00000261733	0.526937583537	D
131285982	9	131285982	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	GLE1	GLE1, RNA export mediator	381.352.468.529.781	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000309971	ENSP00000308622	0.557744416614	D
141128828	2	141128828	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	LRP1B	LDL receptor related protein 1B	0.31034012061215	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000389484	ENSP00000374135	0.558484133165	D
142572878	7	142572878	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	TRPV6	transient receptor potential cation channel subfamily V member 6	0.411426245726465	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000311470	ENSP00000310825	0.691156444308	D
156773422	4	156773422	T	C	exonic	nonsynonymous SNV	ASIC5	acid sensing ion channel subunit family member 5	0	NEW	Mutual	NA	-	ENST00000537611	ENSP00000442477	0.700817969593	D
164786974	3	164786974	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	SI	sucrase-isomaltase	0	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000264382	ENSP00000264382	0.538305670072	D
167522775	1	167522775	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	CREG1	cellular repressor of E1A stimulated genes 1	588.337.643.667.284	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000370509	ENSP00000359540	0.735615079365	D
231941763	2	231941763	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	525.512.301.684.779	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000308696	ENSP00000309474	0.652777777778	D
642597	8	642597	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	ERIC1H	glutamate rich 1	321.723.071.622.067	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000262109	ENSP00000262109	0.372685339087	N
878551	5	878551	A	G	exonic	nonsynonymous SNV	BRD9	bromodomain containing 9	384.498.815.668.261	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000323510	ENSP00000323557	0.453137233544	N
1093411	11	1093411	A	C	exonic	nonsynonymous SNV	MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	0	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000333592	ENSP00000331373	0.283383915023	N
2087856	16	2087856	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	SLC9A3R2	SLC9A3 regulator 2	44.944.156.103.975	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000425442	ENSP00000408005	0.40276394449	N
2230418	16	2230418	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	CASKIN1	CASK interacting protein 1	399.909.803.370.561	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000343516	ENSP00000345436	0.441558255387	N
4171465	19	4171465	C	T	exonic	nonsynonymous SNV	CREB3L3	cAMP responsive element binding protein 3 like 3	0	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000078445	ENSP00000078445	0.513861661941	N
4461552	17	4461552	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	GGT6	gamma-glutamyltransferase 6	0	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000301395	ENSP00000301395	0.359737048411	N
6426509	12	6426509	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	PLEKHG6	pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G6	0.823749360308273	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000011684	ENSP00000011684	0.476012003717	N
7251479	17	7251479	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	ACAP1	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1	25.033.487.351.675	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000158762	ENSP00000158762	0.44033868448	N
7893007	5	7893007	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	256.071.495.447.448	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000264668	ENSP00000264668	0.303782075055	N
8390437	1	8390437	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	SLC45A1	solute carrier family 45 member 1	219.219.416.528.334	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000289877	ENSP00000289877	0.476138639765	N
9090629	19	9090629	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	MUC16	mucin 16, cell surface associated	0	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000397910	ENSP00000381008	0.325601943399	N
10334569	3	10334569	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	GHR1L	ghrelin and obestatin prepropeptide	102.856.915.219.677	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000437422	ENSP00000416768	0.368361153263	N
21396328	13	21396328	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	XPO4	exportin 4	232.768.736.417.605	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000255305	ENSP00000255305	0.406835767173	N
21861457	8	21861457	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	XPO7	exportin 7	481.455.042.346.181	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000252512	ENSP00000252512	0.393691538653	N
23656244	22	23656244	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	BCR	BCR, RhoGEF and GTPase activating protein	370.708.299.177.171	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000305877	ENSP00000303507	0.406644216501	N
23803452	X	23803452	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	68.891.084.419.241	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000379254	ENSP00000368556	0.355731192039	N
26251933	6	26251933	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	HIST1H2BH	histone cluster 1 H2B family member h	126.903.314.645.524	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000356350	ENSP00000348706	0.487936821075	N
31839115	6	31839115	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	SLC44A4	solute carrier family 44 member 4	0.286881147788162	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000229729	ENSP00000229729	0.369014450217	N
34344868	17	34344868	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	CCL23	C-C motif chemokine ligand 23	0.189033824390017	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000293280	ENSP00000293280	0.344345325241	N
36133566	19	36133566	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	ETV2	ETS variant 2	0.321928094887362	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000379021	ENSP00000368307	0.420204661635	N
40317989	19	40317989	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	DYRK1B	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B	411.519.974.938.544	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000323039	ENSP00000312789	0.501113262871	N
41895187	6	41895187	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	BYSL	bystin like	336.457.243.229.586	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000230340	ENSP00000230340	0.403904093367	N
43976361	22	43976361	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	EFCAB6	EF-hand calcium binding domain 6	0.344828496997441	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000262726	ENSP00000262726	0.357008187879	N
44951499	15	44951499	T	C	exonic	nonsynonymous SNV	SPG11	SPG11, spatacsin vesicle trafficking associated	343.295.940.727.611	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000261866	ENSP00000261866	0.498079941186	N
45912719	19	45912719	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	CD3EAP	CD3e molecule associated protein	160.407.132.366.886	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000309424	ENSP00000310966	0.394625263518	N
45945539	21	45945539	C	T	exonic	nonsynonymous SNV	TSPEAR	thrombospondin type laminin G domain and EAR repeats	0.056583528366375	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000323084	ENSP00000321987	0.516832867358	N
47754364	21	47754364	G	T	exonic	nonsynonymous SNV	PCNT	pericentrin	268.032.435.684.402	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000337772	ENSP00000338675	0.316625949969	N
47971597	7	47971597	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	PKD11	polycystin 1 like 1, transient receptor potential channel interacting	0.389566811762726	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000289672	ENSP00000289672	0.391551565539	N
53731515	4	53731515	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	RAS11B	RAS like family 11 member B	236.737.106.564.853	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000248706	ENSP00000248706	0.521108928071	N
58217764	12	58217764	G	A	exonic	nonsynonymous SNV	CTDSP2	CTD small phosphatase 2	562.964.804.418.744	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000398073	ENSP00000381148	0.391567379947	N
71730601	11	71730601	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	NUMA1	nuclear mitotic apparatus protein 1	498.093.926.608.551	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000351960	ENSP00000260051	0.43837947824	N
75279666	10	75279666	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	USP54	ubiquitin specific peptidase 54	209.085.343.045.111	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000339859	ENSP00000345216	0.49118652068	N
76925711	11	76925711	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	MYO7A	myosin VIIA	227.500.704.749.987	NEW	Exclusive	NA	+	ENST00000341717	ENSP00000345075	0.412360221297	N
79937581	X	79937581	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	BRWD03	bromodomain and WD repeat domain containing 3	216.671.544.496.642	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000373275	ENSP00000362372	0.484467792413	N
82444527	15	82444527	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	EFL1	elongation factor like GTPase 1	NA	NEW	Mutual	NA	-	ENST00000268206	ENSP00000268206	0.36596151589	N
95500950	8	95500950	C	A	exonic	nonsynonymous SNV	VIRMA	vir like m6A methyltransferase associated	NA	NEW	Exclusive	NA	-	ENST00000297591	ENSP00000297591	0.488132	

Anexo 8 – Publicaciones.

Ramírez M, García-Castro J, Melen GJ, González-Murillo Á, Franco-Luzón L.

Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology.

Oncolytic Virother. 2015 Oct 14;4:149-55. doi: 10.2147/OV.S66010.

Melen GJ, Franco-Luzón L, Ruano D, González-Murillo Á, Alfranca A, Casco F, Lassaletta Á, Alonso M, Madero L, Alemany R, García-Castro J, Ramírez M.

Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells.

Cancer Lett. 2016 Feb 28;371(2):161-70. doi: 10.1016/j.canlet.2015.11.036.

Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC, Madero L, Ramírez M.

[Establishment of a preclinical neuroblastoma model in immunocompetent mice].

[Article in Spanish; Abstract available in Spanish from the publisher]

Cir Pediatr. 2016 Apr 10;29(2):66-71.

Franco-Luzón L, González-Murillo A, Alcántara-Sánchez C, García-García L, Tabasi M, Huertas AL, Chesler L, Ramírez M.

Systemic oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal carrier cells modulate tumor infiltrating immune cells and tumor microenvironment in mice with neuroblastoma.

Accepted for publication.

Oncotarget.

Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology

Manuel Ramírez¹

Javier García-Castro²

Gustavo J Melen¹

África González-Murillo¹

Lidia Franco-Luzón¹

¹Oncohematología, Hospital Universitario Niño Jesús, ²Unidad de Biotecnología Celular, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract: Oncolytic virotherapy is gaining interest in the clinic as a new weapon against cancer. In vivo administration of oncolytic viruses showed important limitations that decrease their effectiveness very significantly: the antiviral immune response causes the elimination of the therapeutic effect, and the poor natural ability of oncolytic viruses to infect micrometastatic lesions significantly minimizes the effective dose of virus. This review will focus on updating the technical and scientific foundations of one of the strategies developed to overcome these limitations, ie, using cells as vehicles for oncolytic viruses. Among many candidates, a special type of adult stem cell, mesenchymal stem cells (MSCs), have already been used in the clinic as cell vehicles for oncolytic viruses, partly due to the fact that these cells are actively being evaluated for other indications. MSC carrier cells are used as Trojan horses loaded with oncoviruses, are administered systemically, and release their cargos at the right places. MSCs are equipped with an array of molecules involved in cell arrest in the capillaries (integrins and selectins), migration toward specific parenchymal locations within tissues (chemokine receptors), and invasion and degradation of the extracellular matrix (proteases). In addition to anatomical targeting capacity, MSCs have a well-recognized role in modulating immune responses by affecting cells of the innate (antigen-presenting cells, natural killer cells) and adaptive immune system (effector and regulatory lymphocytes). Therefore, carrier MSCs may also modulate the immune responses taking place after therapy, ie, the antiviral and the antitumor immune responses.

Keywords: virotherapy, mesenchymal stem cells, oncolytic adenovirus

Introduction

In recent years, we have seen an increased interest in the application of oncolytic virotherapy for the treatment of human tumors.¹ These treatments have already reached the clinical arena, and the first results of clinical trials have been published. Oncolytic viruses may become a new option in the antitumor armamentarium, although there is still a long way ahead for clarifying indications, dosage, treatment guidelines, and other aspects that will determine the optimization of their use in humans. The therapeutic potential of oncolytic viruses has been repeatedly demonstrated in different in vitro models; however, the administration in experimental animals first, but especially in patients, has put in a more realistic light the therapeutic capacity of oncolytic virotherapy. There are some limitations to the clinical use of oncolytic viruses that decrease their effectiveness very significantly. On the one hand, the antiviral immune response that the body develops causes the elimination of the therapeutic effect following the first administration or even with the first dose in preimmunized patients. Moreover, the poor natural ability of oncolytic viruses to infect micrometastatic

Correspondence: Manuel Ramírez
Oncohematología, Hospital Universitario
Niño Jesús, Avenida Menéndez Pelayo,
65, 28009 Madrid, Spain
Tel +34 91 503 5938
Fax +34 91 503 5902
Email manuel.ramirez@salud.madrid.org

lesions significantly minimizes the effective dose of virus; increasing the dosage does not ensure a greater effect due to increased toxicity as well as due to the antiviral immune response. This problem does not occur in localized tumors, but it is significant in metastatic tumor disease, which is the leading cause of cancer death.

It is not surprising then that strategies to overcome these limitations have been pursued in order to improve the results of oncolytic virotherapy. Several groups, including ours, began to explore years ago the possibility of using cells as vehicles for avoiding those limitations.² First, to increase the amount of viral particles that are released at metastasis areas, exploiting the ability of these cell vehicles to localize and integrate into the tumor masses after intravenous (IV) administration. Microscopic inspection of cancerous lesions identifies a series of accessory cells that are recruited during tumor growth: myeloid cells, macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and mesenchymal cells. IV infusion of any of the aforementioned cells in animals with metastatic cancer has shown a preferential localization in tumor beds. On the basis of this fact, the cells are used as Trojan horses bearing antitumor agents in them, to be released in the right place.³ Various oncolytic viruses and tumor-infiltrating cell types have been evaluated in this strategy, using several tumor models. The common result of these experiments has been the preclinical demonstration of the feasibility of the strategy. In addition to tumor targeting capacity, the cell vehicles can facilitate the therapeutic effect of oncolytic virotherapy, extending its life by hiding the virus from recognition and attack by the immune system in the immediate time after administration. This is critical for all of the aforementioned limitations to have clinical impact.

Mesenchymal cells have arrived at the clinic as oncolytic virotherapy cell vehicles, partly due to the fact that these cells are actively being evaluated for other indications.⁴ In the field of cancer, there are a few early phase clinical trials using mesenchymal stem cells (MSCs). One is evaluating their capacity to home to sites of prostate cancer in men with localized adenocarcinoma of the prostate (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01983709). The second is assessing safety and efficacy of MSCs genetically modified to produce interleukin-12 in head and neck cancer patients (NCT02079324). Two trials are using MSCs as cell carriers for oncolytic virotherapies, with an oncolytic measles virus (NCT02068794) and with an oncolytic adenovirus (NCT01844661). A few years ago, our group began evaluating the use of mesenchymal cells as cell carriers for the administration of an oncolytic adenovirus in children with metastatic neuroblastoma.² During this time,

we have increased our clinical experience with this antitumor strategy. This review will focus on updating the fundamentals that determine their antitumor potential.

Mesenchymal cells

Forty years ago, Friedenstein et al⁵ described the isolation of stromal cells from bone marrow by plastic adherence. These cells had a clonal capacity and the ability to support ectopic bone, stroma, and hematopoietic tissues. At the end of the last century, part of the heterogeneous stroma of bone marrow was categorized as MSCs based on their in vitro potential of trilineage differentiation (osteoblast, adipocyte, and chondrocyte) and self-renewal.⁶ Some studies have further reported MSC differentiation into multiple other cell types of mesodermal and nonmesodermal origin. Nevertheless, such multipotential capabilities of MSCs are not universally accepted.⁷ After their initial discovery in bone marrow, MSCs have been isolated and characterized from several adult and fetal tissues, including adipose, dermis, synovial fluid, umbilical cord blood, placenta, and amniotic fluid.⁶ These stem cells are commonly called marrow stromal stem cells, mesenchymal stromal cells, adipose-derived stromal cells, or MSCs. In 2006, the International Society for Cellular Therapy proposed the denomination of mesenchymal stromal cells and a set of minimal criteria to characterize MSCs: they must be plastic adherent and express CD105, CD73, and CD90 but not CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19, and HLA-DR surface molecules. Moreover, MSCs must differentiate in vitro to osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts.⁸

The use of MSCs for therapeutic applications, especially as tools in cellular therapies for clinical protocols involving immune system alterations, has been deeply explored because of their inherent ability to home to sites of inflammation following tissue injury and deploying their high immunoregulatory capacity.^{4,9} MSCs profoundly affect immune response via their interactions with the cellular components of the innate and adaptive immune system and through cell–cell contact and/or the secretion of soluble factors.¹⁰

Mesenchymal stem cells as carriers

More than a decade ago, Studeny et al¹¹ reported that MSCs contribute to tumor stroma formation after IV administration. This work further demonstrated that MSCs could serve as a platform for the delivery of biological agents into tumors, by genetically overexpressing an antitumor element, IFN-beta in this report, in the carrier cells that resulted in the inhibition

of the growth of malignant cells *in vivo*. Many other papers followed Studeny et al's report,¹¹ proving experimentally that MSCs targeted several models of metastatic tumors and could be used as part of a new class of medicines against cancer. Monitoring of MSCs infused into animals with tumors using different imaging techniques confirmed the preferential localization of these cells in tumor areas.¹² In light of these experimental results, a clear interest emerged in deciphering the molecular basis responsible for the preferential migration of MSCs to sites where cancerous lesions are located. One of the first studies addressing this compared the gene expression profiles of MSCs cultured *ex vivo* with medium from either tumor cells or bone marrow.¹³ Several transcripts were found to be differentially expressed, including chemokines (CXCL12 and CXCL-2), CINC-2, endothelial cell specific molecule-1, fibroblast growth factor-7, nuclear factor- κ B p105, and thrombomodulin. These authors applied a proteomic approach to identify soluble signaling molecules that induced MSC chemotaxis and were present in the conditioned medium of tumor cells. Cyclophilin B and hepatoma-derived growth factor were characterized and shown to promote MSC chemotaxis.¹⁴ It is interesting to note that the exposure of MSCs to cancer cell lines of different histological origins resulted in the upregulation of adhesion molecules in the MSCs that varied depending upon the cell lines used,¹⁵ indicating that the response of MSCs is not universal but modulated by tumor-derived factors.

Similarly, the process of MSC homing is compared to the migration and homing of leukocytes during inflammatory processes. It is assumed that the different steps recognized for leukocytes (tethering, rolling, firm adhesion, and diapedesis)¹⁶ occur similarly after infusing MSCs intravenously. However, extensive studies to verify whether the mediators involved during the migration and extravasation of leukocytes are the same (or what differences may exist) as those of MSCs have not yet been carried out.¹⁷ Although mechanical entrapment of MSCs has been described after IV injection,¹⁸ active arrest of MSCs within inflamed tissues has been demonstrated in studies^{19,20} that showed a role for molecules of the selectin and integrin families. Interfering with the adhesion molecule VLA-4 (that governs the arrest of leukocytes on activated endothelium) reduced the engraftment of MSCs in ischemic myocardium.¹⁹ In a different setting, P-selectin knockout MSCs did not slow down in postcapillary venules compared to wild-type MSCs.²⁰ These results suggest that the engraftment of MSCs within target tissues depends on specific molecular interactions, rather than nonspecific mechanical causes.

A different set of molecules implicated in the homing of MSCs to specific sites, including tumors, are chemokines. They may be released from inflamed tissues, endothelial cells, or directly from tumor cells, and may promote activation of adhesion ligands, transendothelial migration, chemotaxis, and/or subsequent retention in surrounding tissue. MSCs express various chemokine receptors^{21,22} and respond to their corresponding ligands. A number of chemokine signaling pathways have been associated with migratory activities of MSC. The role of the CXCR4-CXCL12 (SDF-1) axis has been controversial. It was reported that only a small proportion of MSCs expressed CXCR4,²³ but cytokines such as insulinlike growth factor 1 increases the expression of CXCR4 on MSC and their migratory capacity *in vitro*.²⁴ The CXCR4-MIF (macrophage migration inhibitory factor) axis, and not the classic CXCR4-CXCL12, has been recently introduced as the key director of MSC migration and infiltration toward tumor cells.²⁵ Using *in vitro* migration and invasion assays and an *in vivo* pulmonary metastasis model, the authors found that CXCR4 was the major receptor used by MIF in the homing of MSCs into the tumor environment. Genetic elimination of either CXCR4 or MIF abrogated the capacity of MSCs for homing into tumors. Human MSCs have been shown to migrate toward CCL2-containing medium derived from the primary cultures of primary cancer patient tissues,²⁶ and in a mouse model of breast carcinoma.²⁷ It is interesting to note that the level of CCL2 expression correlates with the level of matrix metalloproteases (MMPs; MT1-MMP/MMP14),²⁸ for reasons discussed later. Another chemokine axis involved is CCR9-CCL25. Human MSCs express CCR9 in their surface,²¹ while CCL25 is expressed in multiple myeloma cells²⁹ and has a chemotactic function for MSCs.³⁰ All these data on chemokines as recruiters of MSCs are not unexpected since cancer and inflammation are closely related.

The final step in the migratory activity of MSCs deals with transmigration and invasion of the basement membrane of endothelium and degradation of the extracellular matrix (ECM) during chemotaxis. It is known that MSCs produce proteases for achieving this step. Genetic and pharmacologic inhibition of MMP2 in MSCs reduced transendothelial migration *in vitro*.³¹ *In vitro* assays of MSCs invasion through ECM-coated transwell chambers showed that downregulation of MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 significantly impaired the migration of MSCs when compared with control cells.³² Using glioma cells as stimulus, functional inactivation of MMP1 abrogated the migratory potential of MSCs, while the addition of recombinant MMP1 enhanced their migratory capacity. Ectopic expression of MMP1 rendered the cells

responsive to the signaling cues from the glioma cells *in vivo*. Finally, disrupting the interaction MMP1-PAR1 diminished the migratory ability of MSCs.³³ Gelatinases are other proteases produced by MSCs during tissue invasion. Thus, MSCs possess the ability to break down endothelial basement membrane and migrate toward chemotactic factors. Such capabilities are likely a function of their responsiveness to chemotactic factors and production of ECM-degrading enzymes.

Understanding the molecular basis of the targeting ability of MSCs in the context of tumors became an important issue in the field. Being able to manipulate this capacity might open new avenues to improve the results of the delivery. One can envision the genetic manipulation of MSCs to enhance the expression of cell adhesion molecules involved in the processes previously described. An alternative way may be *ex vivo* selection of MSCs with improved migratory capacities, as described by Bolontrade et al.³⁴ The authors compared *in vitro* adhesive capacities during MSCs isolation and then selected a specific subpopulation with the optimal highest adhesiveness, migration toward conditioned media from different cancer cell lines and fresh primary human cancer samples, and increased tumor homing toward tumor xenografts. These characteristics correlated with expression of specific integrins (integrins $\alpha 2$, $\alpha 3$, and $\alpha 5$) and metalloproteases production. A work by Klopp et al²⁶ exploited the capacity of MSCs for migrating toward sites of inflammation by using low dose of irradiation on tumors in *in vivo* models. As early as 48 hours after irradiation, MSCs engrafted at significantly higher levels in irradiated versus unirradiated tumors. The authors characterized transforming growth factor-B1, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor-BB, and CCR2 as mediators of this effect. The results of this elegant work have clear clinical relevance, since radiotherapy is routinely used for treating many different types of cancers.

Mesenchymal stem cells and the immune responses

The immune system has a recognized role in the outcome of virotherapies.³⁵ Natural killer cells interfere with the action of oncolytic viruses, reducing or eliminating their efficacy.³⁶ It is also known that adaptive immunity controls viral infections.³⁷ On the other hand, oncolysis involves tumor cell death, with the possible release of tumor-specific antigens. These antigens, coupled to danger signals associated with viral infection,³⁸ can stimulate an antitumoral immune response, increasing the clinical effect of the virus.³⁹ The

combination of MSCs with oncolytic viruses has important implications in the development of immune responses that occur in these patients, which make them different from the virotherapy used without MSCs. These cells have a well-known role in the function of human antigen-presenting cells and in effector and regulatory leukocytes of the innate and adaptive responses.^{40–47} It has also been reported that autologous MSCs may function as antigen-presenting cells in animal models.^{48,49} Therefore, MSCs may not only act as carrier cells but might as well modulate the immune responses taking place after infusing MSCs loaded with oncolytic viruses, ie, the antiviral and the antitumor immune responses. There are technical limitations in translating the results obtained with oncolytic viruses in preclinical models (alone or in combination with MSCs) when animals are either nonpermissive for the virus (as is the case for oncolytic adenoviruses, and to some extent herpes viruses) or when the viral cycle is too fast for a successful Trojan horse transfer (ie, coxsackie virus or vesicular stomatitis virus). Also critical when studying immune aspects of oncolytic virotherapies is the fact that human cancer cell lines are implanted in immunodeficient animals. Taking into account all these limitations, authors have reported experimental data indicating that MSCs may temporarily hide the presence of the oncolytic virus from the immune system, retarding the attack and inactivation of the virus, thus allowing for a longer therapeutic window. The administration of MSCs as carriers of oncolytic measles virus in passively immunized mice with ovarian cancer resulted in increased survival compared to that of mice treated with naked virus or uninfected MSC.⁵⁰ In a rat model susceptible to human adenovirus infections,⁵¹ the authors evaluated the antiadenoviral immune response following delivery of oncolytic adenoviral vectors using MSCs as carriers, and found improved delivery, enhanced dissemination, and increased persistence of viruses via suppression of the antiviral immune response. A second important aspect is the fact that MSCs may modulate their gene and protein expression profile depending upon the environment.⁵² Oncovirus-infected MSCs would adopt a proinflammatory MSC1 phenotype, and will arrive and lodge into tumor sites, which are “sterilized” inflamed tissues and would promote an immunomodulating MSC2 phenotype on the MSCs.⁵³ The role of the carrier MSCs on the immune response will eventually be the result of these two opposite forces. It is not easy to decide what final phenotype would be preferable for the MSCs when carrying oncolytic viruses in cancer patients. On the one hand, inflammation may favor the benefits of virotherapies; therefore, a predominant MSC1 phenotype

would be desirable.⁵⁴ However, on the other hand, MSCs less responsive to viral infection might hide the virus from recognition and attack by the patient's innate and adaptive immune system before viral delivery at the metastasis sites, favoring better conditions for the in situ oncolytic effect. Figure 1 depicts the potential effects of MSCs as carriers for oncolytic viruses and as modulators of the antiviral and antitumor immune responses.

Practical questions

It is not currently known what oncolytic virus would be best to combine with MSCs for clinical uses. It may be anticipated that a candidate virus should possess a few characteristics before it can be considered for the Trojan horse approach using MSCs. On the one hand, the oncolytic virus must be able to infect the cellular vehicle through their own receptors (virus specific) that have to be expressed by MSCs or through modified manipulation (such as the RGD motif). Second, the lytic cycle of the virus must provide enough time for carrier cells as to home into the tumor, as described earlier. Third, virus immunogenicity is a key aspect. Fourth, the virus has to go unnoticed by the immune system as long as possible. Here, since MSCs will provide initial concealment, it seems preferable to have a virus that generates a strong local inflammatory

response to trigger further leukocyte infiltration and change the immunosuppressive status of the tumor. We have used an oncolytic adenovirus in our strategy. Initially, MSCs infected with adenoviral vectors showed no major changes in phenotypic or functional characteristics,⁵⁵ so all considerations commented earlier should be valid when they are infected with oncolytic adenoviruses for treating patients. MSCs have a 48–72-hour viability window following oncoviral infection,² after which they should disappear because of the viral replication within that destroys them. Therefore, their function as vehicles should have already taken place. Studies on the kinetics of infused MSCs in animals have shown that this length of time should be enough.^{56,57} It is important to consider that intravenously infused MSCs may change location after their initial first-pass effect. Their function as immune modulators, either as MSC1 or MSC2, should also disappear within this time frame. In this case, their immune effect should primarily be related to the antiadenoviral response, rather than the antitumoral one. However, it has been recently reported that MSCs have a short-term memory and retain information about danger signals of the environment,⁵⁸ which may allow them to participate in the antitumor immune response once they home into the metastasis sites. It is not known how MSCs, responsible of many tolerant mechanisms, may affect the tumor microenvironment during the time they are functionally viable.

The combination of MSCs and oncolytic viruses has not yet been pursued in the clinical setting by many groups. Although different sources of MSCs have been used in pre-clinical models, there is no data on the impact that the source (bone marrow and adipose tissue are the two most commonly used in clinic for other diseases)⁴ or the histocompatibility (autologous, related, or unrelated donor) of MSCs may have in clinical outcome, both interesting issues for future research. A Mayo Clinic group is leading a Phase I/II trial for assessing safety, dosage, and clinical effect of adipose tissue-derived MSCs infected with an oncolytic measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter (MV-NIS) in patients with relapsed ovarian cancers (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02068794). This trial is the continuation of preclinical experiments carried out by the investigators.⁵⁷ Our group² has been developing a strategy for the treatment of refractory and metastatic solid tumors in children for the last 10 years, based on the administration of Celyvir: autologous bone marrow-derived MSCs infected with ICOVIR-5, an oncolytic adenovirus⁵⁹ designed for systemic treatment of disseminated tumors. ICOVIR-5 contains several modifications that give selective replication ability in cancer cells in which the Rb/E2F route is deregulated.⁶⁰ Our strategy uses systemic infusions of Celyvir

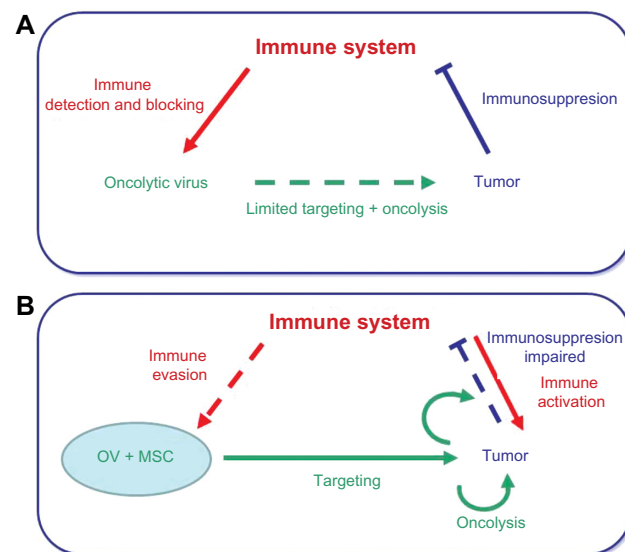


Figure 1 Mesenchymal stem cells, carriers for oncolytic viruses and beyond.

Notes: (A) The immune system interferes with the action of OV, reducing or eliminating their efficacy as anticancer agents. Independently, the tumor microenvironment inactivates the attack of the immune system. (B) MSCs enhance the oncolytic action of OV by protecting them from the immune system while delivering them at the tumor sites. In addition, MSCs may interfere with the mechanisms of immunosuppression developed by the tumor microenvironment, enabling an antitumor immune response. Solid lines indicate dominant action whereas dotted lines indicate impaired action. Colors identify each main character, ie, immune response (red), tumor (blue), and virotherapy (green).

Abbreviations: OV, oncolytic viruses; MSCs, mesenchymal stem cells.

aiming at enhancing the targeted delivery of the oncolytic adenovirus to the metastasis sites based on the natural tumor tropism of the MSCs.⁶¹ Our initial clinical experience has been an already finished⁶² compassionate use program in children with refractory tumors, mainly neuroblastoma, and a currently open clinical trial recruiting children and adult patients with advanced cancers (EudraCT2008-000364-16; ClinicalTrials Identifier: NCT01844661). Although a final analysis of these experiences is still pending, after more than 300 doses administered to over 30 children plus six adults with cancer, the first conclusion to be drawn is that tolerance is excellent, with viral-related toxicities being very mild and self-limiting. Hematological and biochemical controls performed to patients during treatment with Celyvir have all been in the normal range. Furthermore, in addition to the oncolytic capacity of Celyvir, the antitumor immune response seems essential in the clinical course of this therapy. We will provide a thorough analysis when the trial is completed.

Conclusion and future perspectives

Delivered by MSCs, oncolytic virotherapies may add value to the intrinsic viral oncolytic capacities and immunotherapeutic effects¹ (see, for instance, the recent review by Sampath and Thorne⁶³ on oncolytic virotherapies). Several characteristics of the MSCs, related to their migratory and immune-modulation capacities, contribute to the success of the new medicinal product. Enhancing our understanding of the mechanisms governing MSCs migration and MSCs immune modulation of the antiviral and antitumor immune responses will help in designing safer and more efficacious therapies.

Disclosure

The authors report no conflicts of interests in this work.

References

- Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):559–567.
- García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, et al. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(7):476–483.
- Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther*. 2009;17(10):1667–1676.
- García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(10):1453–1468.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230–247.
- Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013;45:e54.
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):126–131.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.
- Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010;28(3):585–596.
- Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. 2015;2015:394917.
- Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 2002;62(13):3603–3608.
- Reagan MR, Kaplan DL. Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells*. 2011;29(6):920–927.
- Menon LG, Picinich S, Koneru R, et al. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells*. 2007;25(2):520–528.
- Lin SY, Yang J, Everett AD, et al. The isolation of novel mesenchymal stromal cell chemotactic factors from the conditioned medium of tumor cells. *Exp Cell Res*. 2008;314(17):3107–3117.
- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(10):730–738.
- Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*. 2005;7:151–185.
- Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):206–216.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863–868.
- Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXCR4 chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*. 2007;18(8):2873–2882.
- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006;108(12):3938–3944.
- Chamberlain G, Wright K, Rot A, Ashton B, Middleton J. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS One*. 2008;3:e2934.
- Wu Y, Zhao RC. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem Cell Rev*. 2012;8(1):243–250.
- Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104(9):2643–2645.
- Li Y, Yu X, Lin S, Li X, Zhang S, Song YH. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356:780–784.
- Lourenco S, Teixeira VH, Kalber T, Jose RJ, Floto RA, Janes SM. Macrophage migration inhibitory factor – CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors. *J Immunol*. 2015;194(7):3463–3474.
- Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, et al. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2007;67(24):11687–11695.
- Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, et al. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):5020–5027.
- Saji H, Koike M, Yamori T, et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*. 2001;92(5):1085–1091.

29. Xu S, Menu E, De Becker A, Van Camp B, Vanderkerken K, Van Riet I. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are attracted by multiple myeloma cell-produced chemokine CCL25 and favor myeloma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells*. 2012;30(2):266–279.
30. Binger T, Stich S, Andreas K, et al. Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25. *Exp Cell Res*. 2009;315(8):1468–1479.
31. De Becker A, Van Hummelen P, Bakus M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*. 2007;92(4):440–449.
32. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007;109(9):4055–4063.
33. Ho IA, Chan KY, Ng WH, et al. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells*. 2009;27(6):1366–1375.
34. Bolontrade MF, Sganga L, Piaggio E, et al. A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2689–2702.
35. Melcher A, Parato K, Rooney CM, Bell JC. Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Mol Ther*. 2011;19(6):1008–1016.
36. Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Price R, et al. NK cells impede glioblastoma virotherapy through Nkp30 and Nkp46 natural cytotoxicity receptors. *Nat Med*. 2012;18(12):1827–1834.
37. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004;78(11):5535–5545.
38. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301–305.
39. Qiao J, Kottke T, Willmon C, et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat Med*. 2008;14(1):37–44.
40. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214–2219.
41. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120–4126.
42. Li YP, Paczesny S, Lauret E, et al. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol*. 2008;180(3):1598–1608.
43. Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009;113(1):46–57.
44. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327–1333.
45. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):34.
46. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):1–8.
47. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008;93(9):1301–1309.
48. Chan JL, Tang KC, Patel AP, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006;107(12):4817–4824.
49. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006;107(6):2570–2577.
50. Mader EK, Maeyama Y, Lin Y, et al. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res*. 2009;23(7):246–255.
51. Ahmed AU, Rolle CE, Tyler MA, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells loaded with an oncolytic adenovirus suppress the anti-adenoviral immune response in the cotton rat model. *Mol Ther*. 2010;18(10):1846–1856.
52. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392–402.
53. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
54. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45590.
55. Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, et al. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: *in vitro* responses and *in vivo* immune responses after cell transplantation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42662.
56. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):12–20.
57. Mader EK, Butler G, Dowdy SC, et al. Optimizing patient derived mesenchymal stem cells as virus carriers for a phase I clinical trial in ovarian cancer. *J Transl Med*. 2013;11:20.
58. Liu GY, Liu Y, Lu Y, et al. Short-term memory of danger signals or environmental stimuli in mesenchymal stem cells: implications for therapeutic potential. *Cell Mol Immunol*. Epub March 16, 2015. doi: 10.1038/cmi.2015.11.
59. Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther*. 2007;15(9):1607–1615.
60. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect *in vivo*. *Cancer Res*. 2007;67(17):8255–8263.
61. Cussó L, Mirones I, Peña-Zalbidea S, García-Vázquez V, García-Castro J, Desco M. Combination of single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging to track 111 in-oxine-labeled human mesenchymal stem cells in neuroblastoma-bearing mice. *Mol Imaging*. 2014;13. doi: 10.2310/7290.2014.00033.
62. Ramírez M, García-Castro J, Alemany R, et al. Virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells for children with metastatic and refractory neuroblastoma: results of a trial of compassionate use [abstract]. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(Suppl 2):S107.
63. Sampath P, Thorne SH. Novel therapeutic strategies in human malignancy: combining immunotherapy and oncolytic virotherapy. *Oncolytic Virother*. 2015;4:75–82.

Oncolytic Virotherapy

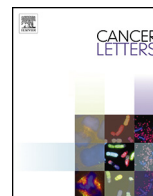
Publish your work in this journal

Oncolytic Virotherapy is an international, peer-reviewed, open access online journal publishing original research, study protocols, reviews, editorials and commentaries on all aspects of oncolytic virology, namely the application of oncolytic viruses for the treatment of cancer. Specific topics in the journal include: Rationale and theoretical aspects of oncolytic virotherapy including *in vitro*, *in vivo* and mathematical

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/oncolytic-virotherapy-journal>

modeling; and practical application and problem solving in the clinic including identification of potential responders through biomarkers and genetic profiling. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Dovepress



Original Articles

Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells



Gustavo J. Melen^{a,b}, Lidia Franco-Luzón^c, David Ruano^{b,d}, África González-Murillo^{a,b}, Arantzazu Alfranca^e, Fernando Casco^f, Álvaro Lassaletta^{b,d}, Mercedes Alonso^g, Luís Madero^{b,d}, Ramón Alemany^h, Javier García-Castro^e, Manuel Ramírez^{b,d,*}

^a Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Madrid, Spain

^c Fundación Oncohematología Infantil, Madrid, Spain

^d Oncohematología, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

^e Unidad de Biotecnología Celular, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^f Anatomía Patológica, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

^g Microbiología, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

^h Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2015

Received in revised form 24 November 2015

Accepted 27 November 2015

Keywords:

Neuroblastoma

Oncolytic virotherapy

Mesenchymal stem cells

Immune response

Cell migration

ABSTRACT

We report here our clinical experience of a program of compassionate use of Celyvir – autologous marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) carrying an oncolytic adenovirus – for treating children with advanced metastatic neuroblastoma. Children received weekly doses of Celyvir with no concomitant treatments. The tolerance was excellent, with very mild and self-limited viral-related symptoms. Patients could be distinguished based on their response to therapy: those who had a clinical response (either complete, partial or stabilization) and those who did not respond. We found differences between patients who responded versus those who did not when analyzing their respective MSCs, at the expression levels of adhesion molecules (CCR1, CXCR1 and CXCR4) and in migration capacities in transwell assays, and in immune-related molecules (IFN γ , HLA-DR). These results suggest interpatient differences in the homing and immune modulation capacities of the therapy administered. In addition, the pretherapy immune T cell status and the T effector response were markedly different between responders and non-responders. We conclude that multidoses of Celyvir have an excellent safety profile in children with metastatic neuroblastoma. Intrinsic patients' and MSCs' factors appear to be related to clinical outcome.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Introduction

Oncolytic virotherapy is gaining interest in the clinic as a new weapon against cancer [1]. Various clinical trials have been conducted in adults and to a lesser extent also in pediatric patients [2]. Initial results have given information on the toxicities [3] and mechanism of action of this new strategy [4]. Different wild type or genetically engineered viral strains have been used, injected either systemically or intratumorally into patients with advanced or non-curable cancers. Oncolysis is not the only benefit that virotherapy can deliver; it is now well accepted that an important aspect of oncolytic viruses is the antitumor immune response they can initiate or reactivate within the patients, which translates into clinical re-

sponses [1]. The role of the immune system during virotherapies has a second edge though. The antiviral immune response of the patients is a major threat and limits the effects of oncolytic viruses [5,6]. The antiviral response may minimize the amount of viruses that eventually reach tumor sites upon systemic delivery, while increasing the doses may only cause higher toxicity and further sensitization toward the oncovirus.

We reported an initial clinical experience in the use of CELYVIR in 4 children with advanced neuroblastoma (NB) [7], the most frequent extracranial solid tumor in pediatric patients. Children with metastatic NB who relapse or develop refractory disease have a dismal prognosis; therefore, new strategies are needed in order to improve the outcome of these patients. CELYVIR is the acronym for autologous mesenchymal stem cells (MSCs) infected with ICOVIR-5, an oncolytic adenovirus [8] designed for systemic treatment of disseminated solid tumors. ICOVIR-5 contains several modifications that give it selective replication ability in cancer cells in which

* Corresponding author. Tel.: +34 915035938; fax: +34 915035902.

E-mail address: manuel.ramirez@salud.madrid.org (M. Ramírez).

the Rb/E2F route is activated [9]. Our strategy consists of systemic infusions of CELYVIR aiming at enhancing the targeted delivery of the oncolytic adenoviruses to the metastases based in the natural tumor tropism of the MSCs. Here, we now report the complete program of compassionate use of this new antitumor medicine, after treating 12 additional children. We have gathered information that confirms the safety of this procedure, enabling numerous infusions per child, amounting to very high doses of virus with very low toxicities. We have also found some clinical responses in our cohort. Patients who responded to treatment showed interesting differences in immunity, before and during treatment, compared to children without response. In addition, their MSCs showed differences in the expression of cell adhesion molecules and immune-related genes when comparing both groups of patients.

Patients and methods

Patients

Twelve patients diagnosed with refractory neuroblastoma were enrolled in a program of compassionate use. The local Research Ethics Board and the Spanish Medicine Agency (AEMPS) approved each patient's treatment in an individualized basis, and informed consent was obtained from each participant. Table 1 shows patients' and infusions' characteristics. Toxicities were studied, recording clinical symptoms and signs of adverse effects, and by hematological and biochemical analysis done in blood samples prior to each infusion. Clinical responses were evaluated after the 6th dose with the level of serum enolase and with ^{123}I MIBG-scintigraphy, comparing the number of lesions pre- and post-therapy.

Cell culture

Bone marrow MSCs were obtained from the iliac crest of patients as previously described [7]. Briefly, mononuclear cells were obtained by Ficoll gradient centrifugation (400 g, 25 min, 20 °C) and cultured in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT) and 1% penicillin–streptomycin (P/S, Gibco). The medium was replaced after 48 hours. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂. MSC production complied with the principles of Good Manufacturing Practice (GMP) in an AEMPS-approved clean room.

For CELYVIR preparation, cell cultures were washed with PBS, trypsinized (TrypLE Express, Life Technologies, Carlsbad, CA) and MSCs resuspended in 25 mL of complete medium. MSCs received 30 Gy irradiation, fulfilling a request of AEMPS. 3×10^6 cells/mL cells were then infected with ICOVIR-5 [8] at 200 MOI during 120 min at 37 °C,

5% CO₂ in DMEM. Infected cells were then washed and resuspended in 50 mL of 0.9% saline supplemented with 2% human albumin.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis was performed with FACSCanto II and FACSDiva software v6.1.2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Data acquisition and analyses of cell adhesion and immune-related molecules were performed on the CELYVIR product, i.e., after MSCs were irradiated and infected with ICOVIR-5. The mean fluorescence intensity (MFI) was obtained for each adhesion molecule. Expression levels were normalized to those of their respective isotype control to allow comparisons. The list of molecules studied is available as Supplementary material.

Peripheral blood leukocyte subtypes were studied as previously described by our group [10]. Fresh tumor biopsies were mechanically disaggregated, filtered through a nylon mesh cell strainer, 100 μm (BD Bioscience), and cell suspension was processed for flow cytometry. Dead cells were excluded by 7-AAD staining.

Histological studies

Tumor biopsy specimens from patient UPN5 were fixed in 10% neutral formalin. Paraffin-embedded sections were cut at 3 μm and stained for hematoxylin–eosin. Several antibodies were used for staining tumor infiltrating human leukocytes (see Supplementary Fig. S4). An automated staining system (Dako Autostainer, DakoCytomation, Denmark) was used in combination with a two-step peroxidase-labeled polymer system (Envision System, Dako, Denmark).

Cell migration assays

NB1691 cells (kindly provided by Dr. A. Davidoff of St. Jude's Children's Research Hospital) were seeded at 25,000 cells/cm² in the lower chamber of a transwell multiwell plate (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), in 1% P/S DMEM, and 20,000 Celyvir-MSCs were seeded on the gelatine-coated upper chamber. After 24 h at 37 °C, 5% CO₂, transwells were washed and non-migrated cells were removed with a cotton swab previously dipped in PBS. Migrated cells were fixed in 10% formalin for 20 minutes and stained with 0.2% crystal violet in 10% formaldehyde for 15 minutes. Finally, transwells were washed twice with water and allowed to dry. Each sample was tested in triplicate.

For specific chemokine assays, 10 ng/mL of either CXCL12 or CCL5 was tested following the same scheme as for NB1691. Monoclonal antibodies against these two molecules (200 ng/mL) or monoclonal antibodies against their counterpart receptors (CXCR4 and CCR1,

Table 1
Patients' characteristics.

ID	Gender	Lines TH	Celyvir doses	Cells ($\times 10^6$)	Virus	PCR PB	Outcome
UPN5	F	3	70	2640	2.6E+14	+	SD
UPN6a	M	3	6	226	4.5E+12		CR
UPN6b		5	29	1013	2.3E+13	+	PR
UPN7	F	4	9	520	5.2E+13	ND	PD
UPN10	M	4	6	160	1.6E+13	ND	PD
UPN11	M	4	4	150	1.5E+13	ND	PD
UPN12	F	4	10	340	3.4E+13	ND	PD
UPN13	M	4	8	280	2.8E+13	ND	PR
UPN16	F	3	7	150	1.5E+13	+	PD
UPN18	F	4	14	300	3.0E+13	+	PD
UPN19	M	4	9	220	2.2E+13	+	PR
UPN20	F	3	6	290	2.9E+13	+	PD
UPN21	M	6	8	176	1.7E+13	+	PD

ID, identification; TH, therapy; PCR PB, detection of adenoviral genome in peripheral blood by PCR; UPN, unique patient number; SD, stable disease; PR, partial response; CR, complete response; PD, progressive disease; ND, not done.

respectively, at 100 ng/mL) were used as controls. Chemokines and antibodies were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Gene expression profile

RNA from Celyvir-MSCs and from pre-irradiated MSCs was isolated with Absolutely RNA microprep kit (Agilent, Santa Clara, CA) and cDNA synthesized with SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen, Carlsbad, CA). qRT-PCR was performed with TaqMan Gene expression assays for the following genes: IL-6 Hs00985639_m1, IL-8 Hs00174103_m1, IL-10 Hs00961622_m1, CCL5 Hs00982282_m1, CXCL10 Hs01124251_g1, IFN γ Hs00989291_m1, TNF α Hs01113624_g1, GAPDH Hs02758991_g1, TGF β 1 Hs00998133_m1, TGF β 2 Hs00234244_m1, TGF β 3 Hs01086000_m1, VEGF-A Hs00900055_m1, IDO1 Hs00984148_m1, IDO2 Hs01589373_m1 and the Taqman Gex master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's instructions. Each sample was analyzed as independent duplicate for each set of primers and probes.

Statistics

The Shapiro–Wilk test was performed first to find whether values followed a normal distribution. Then, comparisons between quantitative variables were done using the Student's t-test (for samples with normal distribution) or the Wilcoxon's rank-sum test (Mann–Whitney statistic, for samples with non-normal distribution). Differences were considered significant with a p value below 5%. The STATA software 11.0 (StataCorp, College Station, TX) was used. Figures represent mean \pm standard error of the mean.

Results

CELYVIR therapy and follow-up

Twelve patients diagnosed of refractory neuroblastoma received multidoses of CELYVIR (systemic infusion of autologous MSCs infected with the oncolytic adenovirus ICOVIR-5) under a program of compassionate use. The children received weekly multidoses of CELYVIR (minimum 4, maximum 70; total 186) as sole treatment. Total cells (min. 150×10^6 , max. 2640×10^6) and total viral particles (min. 4.5×10^{12} , max. 2.64×10^{14}) varied among patients. Blood cell counts and serum biochemical parameters were in normal ranges following each infusion. Mild and auto limited viral-related toxicities were the only adverse effects detected. None of the 12 patients experienced grade 3+ toxicities. The most frequent toxicity observed was low-grade fever and flu-like symptoms in 10 patients. Clinical outcomes were progression (n = 8), stable disease (n = 1), partial response (n = 3) and complete response (n = 1). UPN6 received CELYVIR in 2 separate occasions. This patient reached a complete response after the first cycle; however, he had a brain plus extracranial (bone, skin) relapse 6 months later and received a second round of CELYVIR, achieving a partial response.

We compared different biomarkers in 2 groups of the above-described patients: those who had a positive clinical response to treatment (either complete, partial or stabilization; n = 5) and those who did not respond (n = 8).

Adenoviral replication was studied in peripheral blood (PB) samples using a PCR method [7]. We found adenoviral genomes in the PB of all patients studied (Table 1), without differences among patients that responded and those who did not. PCRs were performed 7 days after CELYVIR infusions, a time when positive results indicate *in vivo* secondary infection and replication.

We followed the absolute numbers of circulating lymphocytes before and after CELYVIR therapy and found changes in all patients. Patients who responded had significantly higher counts of

T lymphocytes pre-therapy (p = 0.0157, Wilcoxon's test). The difference was found both in CD4 and CD8 (Fig. 1). Absolute numbers of T lymphocytes remained higher, mainly in CD4 (not significantly for CD8), along therapy among the patients that showed a clinical response. Numbers of leukocytes of the innate immunity such as neutrophils (NT), monocytes (MO), natural killer (NK) cells, and of the adaptive response like B-lymphocytes were not significantly different when comparing responder and non responder patients. Starting from pre-therapy values, NK, B-lymphocyte and T-lymphocyte (CD4 and CD8) cell counts rose during treatment with CELYVIR. The increases above basal levels were not significantly different comparing patients that responded to CELYVIR versus those who did not. However, the variations over basal values were very mild among patients who responded to CELYVIR, while those who did not respond had marked increases in all populations of circulating lymphocytes (Supplementary Fig. S1).

We analyzed the kinetics of circulating CD4 and CD8 T lymphocyte subsets: naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM) and effector memory 45RA (EMRA) (Fig. 2). Naïve CD4 and CD8 T lymphocyte numbers in children who responded were always above those of children with no response. Major changes in the numbers of these T cell subpopulations affected to the EM and EMRA subsets of children who did not respond to the therapy, both in CD4 and CD8 T lymphocytes, and also in CD8 CM. Compared to responder patients who presented an almost flat kinetic, non-responders showed a trend toward increasingly higher numbers of these subpopulations during therapy. These differences were not statistically significant. Finally, we also analyzed the subpopulation of circulating CD4⁺CD25⁺CD127^{low/negative} containing T regulatory (T_{reg}) lymphocytes [11] and did not find statistically significant differences between both groups of patients (Supplementary Fig. S2).

UPN5 was the patient who received the highest numbers of infusions and allowed us to perform an extensive follow-up (Supplementary Fig. S3). After diagnosis, she received 3 lines of therapy, with progression after each one. Weekly infusions of CELYVIR were started as the sole therapy, with stabilization of the disease in the first evaluation (after the first 2 months). Peripheral blood T lymphocyte counts steadily rose from low basal levels. From a clinical point of view, the improvement of her general condition during the first year or CELYVIR treatment was remarkable. She initiated therapy pale, tired, sad and anorexic. After four months, she no longer looked sick and gained 2.5 kg. Her Lansky performance status improved from 50 to 90. The clinical examination became normal (except the abdominal mass). CELYVIR was discontinued after 12 months and infusions of interleukin-2 (IL-2) were then administered, at doses of 6×10^6 U each, in order to *in vivo* stimulate the antitumor immune response. PB cell counts declined with this treatment, so IL-2 administration was discontinued after 2 months and CELYVIR infusions were then resumed. An initial increase of circulating T lymphocytes followed the reinfusion of CELYVIR and lasted for 3 months, after which the disease reactivated and progressed to an end-stage situation. During the last period of CELYVIR infusions, lymphocyte cell counts kept decreasing, coinciding with the progressive raise in biochemical markers of the tumor (see enolase and LDH curves in Supplementary Fig. S3). In UPN5 we obtained biopsies of the primary tumor before and after CELYVIR therapy. Immunohistochemistry studies in paraffin-embedded biopsies showed the presence of different populations of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), pre and post CELYVIR therapy (Supplementary Fig. S4). Interestingly, Ki67 staining showed an increase in the activity of TILs within nodular structures in the tumor mass after CELYVIR therapy. Moreover, flow cytometry of tumor biopsies obtained at 2 different moments during CELYVIR therapy (stable disease and end-stage disease) showed notable changes in the CD4:CD8 ratio and naïve:central memory:effector immunophenotypes of TILs (Supplementary Fig. S5). The presence of adenovirus genome in the

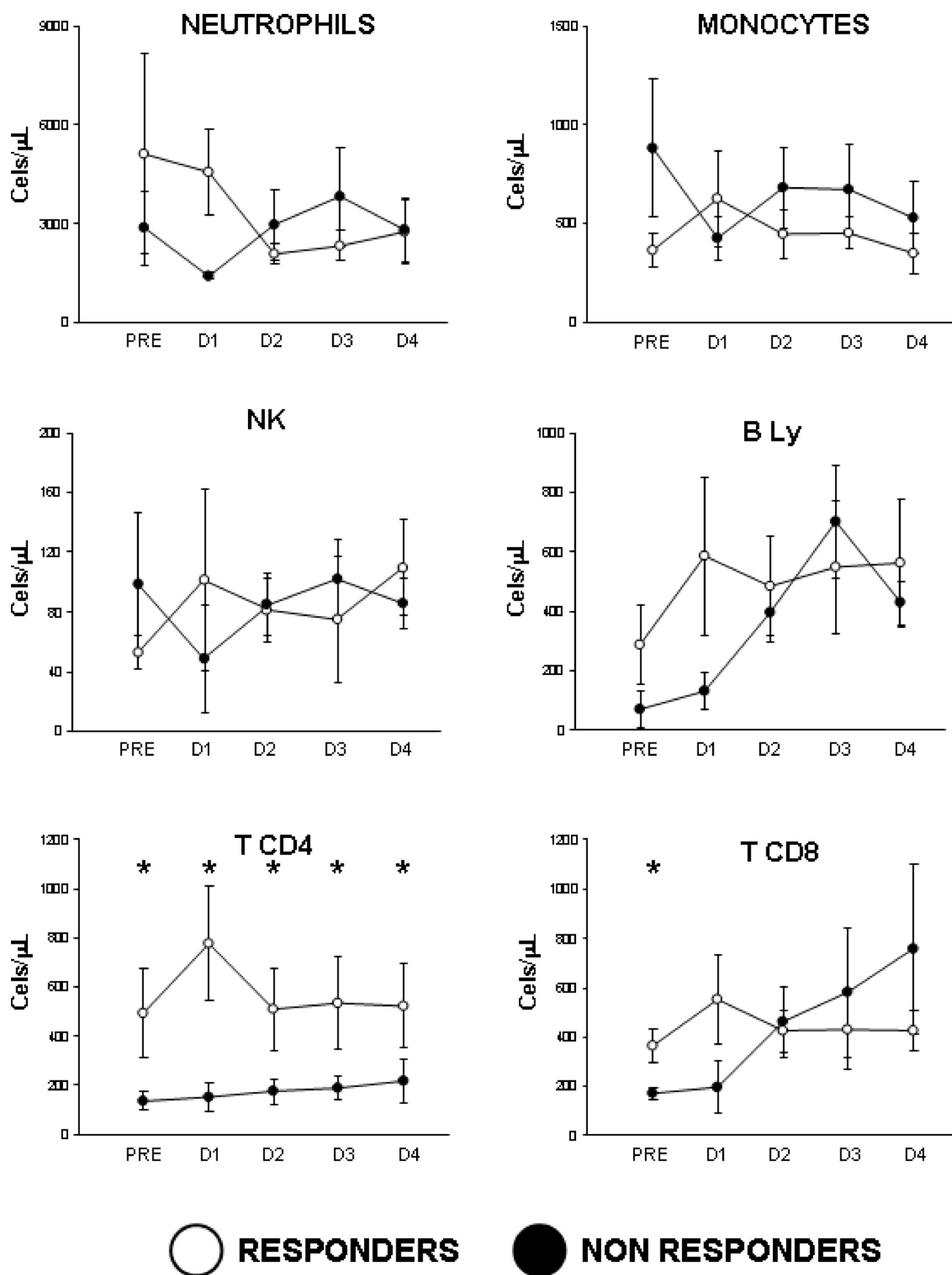


Fig. 1. Changes in circulating leukocyte subpopulation counts in patients treated with CELYVIR. Absolute peripheral blood cell counts of different leukocyte subpopulations from patients who responded (white circles) and who did not (black circles), pre-therapy and after the first 4 doses (D) of CELYVIR. Figures represent the mean \pm standard mean error. * $p < 0.05$.

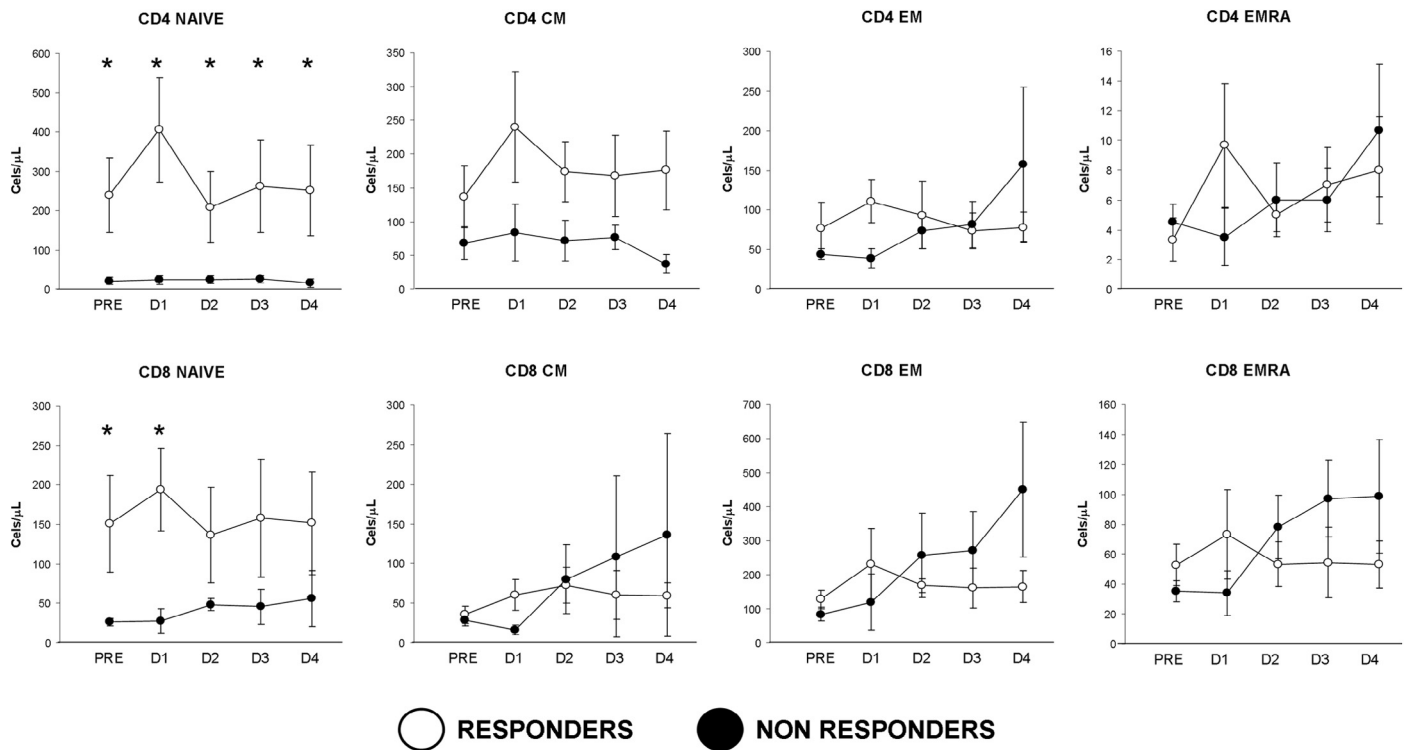


Fig. 2. Changes in circulating T lymphocyte subpopulation counts in patients treated with CELYVIR. Absolute peripheral blood cell counts of naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CD45RA⁺CCR7⁺), effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻), and effector memory CD45RA (CD45RA⁺CCR7⁻), from patients who responded (white circles) and who did not (black circles), pre-therapy and after the first 4 doses (D) of CELYVIR. * $p < 0.05$.

tumor biopsies was studied by PCR with negative results in all samples.

Adhesion molecule profile of MSCs and clinical outcome

MSCs exhibit tropism for damaged tissues as well as the tumor microenvironment and many different receptors have been implicated in the homing of MSCs. We studied expression levels of several adhesion molecules on the surface of the CELYVIR product and found that irradiated and infected MSCs of patients that had a positive clinical response expressed significantly ($p < 0.05$) higher levels of CXCR1 and CCR1 than MSCs of patients with no response (Fig. 3). In addition, the levels of CXCR4 tended to be higher, almost statistically significant ($p < 0.1$), in the group of patients that responded after receiving CELYVIR (Fig. 3). [Supplementary Table S1](#) shows the results of all molecules studied.

MSCs migrated toward chemotactic stimuli and neuroblastoma cells

Since chemokine receptors expressed by MSCs were associated to clinical outcome, we studied whether the results on expression levels translated into functional differences. We first studied whether CELYVIR products used for the patients were able to migrate toward chemotactic stimuli. We performed 2 sets of experiments using transwell assays. We first induced chemotaxis by adding single chemokines (CCL5 – ligand for CCR1 – or SDF1 – ligand for CXCR4) to the lower chamber of standard transwell systems. Results showed that the MSCs used in CELYVIR responded to each chemotactic stimulus with migration values significantly higher than those in basal conditions (Fig. 4A and 4B). Chemotaxis was inhibited when blocking either the chemoattractant or the chemokine receptor with

specific antibodies. In the second set of experiments, neuroblastoma cells were placed in the lower chamber and used as chemotactic stimuli. The MSCs used in the production of CELYVIR responded by significantly increasing their migration toward tumor cells (Fig. 4C). We finally compared chemotactic responses of CELYVIR products of patients that had a positive clinical response versus those of patients with no response, in the above mentioned transwell assays. Although the migration values were higher in MSCs from patients who had clinical responses, the differences were not statistically significant (Fig. 4D and 4E).

Effects of irradiation on MSC chemotactic capacities

The preparation of CELYVIR implies that MSCs receive lethal irradiation and are infected by an oncolytic virus. Irradiating MSC was a requirement of AEMPS because of the controversial reports on the capacity of MSCs for favoring tumor progression. It is not known how this manipulation may affect the capacity of MSCs in CELYVIR products for migrating and homing into the metastatic nodules before delivering their oncolytic cargos. We have studied the expression levels of cell adhesion molecules and the chemotactic capacity of MSCs before and after receiving a dose of 30 Gy, as part of the process of CELYVIR production. Most of the cell adhesion molecules studied upregulated their expression levels upon irradiation (not shown). However, this effect did not translate into higher migration capacity in the transwell assays. In fact, irradiated MSCs had significantly lower migration values toward chemokines or neuroblastoma cells compared to non-irradiated MSCs ([Supplementary Fig. S6](#)). These results were not different among MSCs from children that responded to CELYVIR or those who did not, reflecting a universal negative effect of high-dose irradiation in MSC migration capacity.

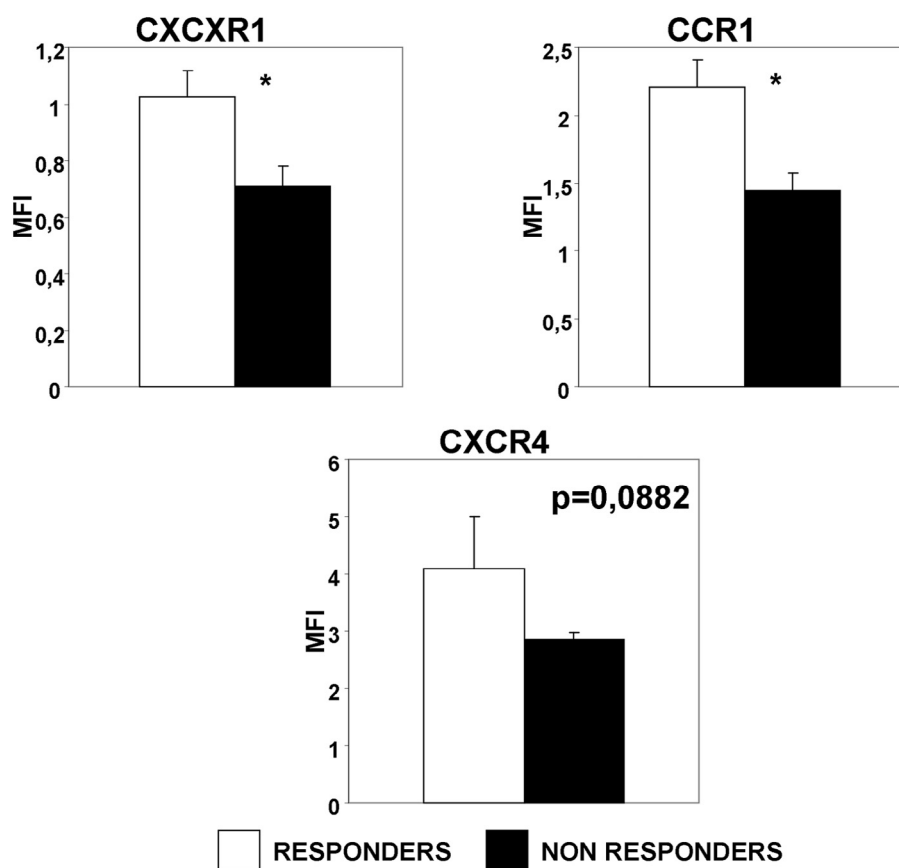


Fig. 3. Mesenchymal stem cells in the CELYVIR products of patients who responded expressed higher levels of chemokine receptors. Relative expression levels of CCR1, CXCR1 and CXCR4 were calculated by the mean fluorescence intensity by flow cytometry and normalized to the corresponding isotype. Patients who responded, white bars; non-responder patients, black bars. * $p < 0.05$.

Immune molecule profile of MSCs and clinical outcome

We determined the levels of immune related genes expressed by the infused MSCs using RTqPCR assays (Supplementary Table S2). Expression levels were normalized to those of MSCs from healthy donors. We found that IFN γ was expressed at significantly lower levels by the CELYVIR product of children with clinical responses (Fig. 5A), while IDO, IL6, IL8 and VEGF α levels showed a decrease in these patients which almost reached statistical significance ($p < 0.1$). We also studied the expression levels of several immune-related molecules on the surface of MSCs of patients treated with CELYVIR by flow cytometry (Supplementary Table S3). We found that irradiated and infected MSCs of patients that had a positive clinical response expressed significantly higher levels of HLA-DR than MSCs of patients with no response ($p < 0.05$) (Fig. 5B).

Discussion

Intratumorally or systemically administered oncolytic viruses for humans with advanced cancers have been increasingly explored during years [12]. We used MSCs as carriers for systemic administration of an oncolytic adenovirus as a first-in-humans therapy in a small cohort of children with refractory NB, with initial promising results [7]. We here update our previously reported experience with CELYVIR to 12 additional children with this aggressive type of cancer, confirming the excellent toxicity profile of the therapy. After infusing a significant number of doses, amounting to high numbers of cells and viral particles in each patient, we only documented auto limited mild or minor viral-related toxicities (fever,

chills, and discomfort). It is important to underscore this fact because the cohort of patients had previously received at least 3 lines of chemotherapies, with the concomitant toxicities known in heavily treated cancer patients. It appears that the combination of mesenchymal cells and oncolytic adenovirus is a safe treatment that can be administered in an intensive schedule and for which a maximum tolerated dose has not been achieved in our protocol. The highest single dose administered in our cohort was 5 million cells/kg. Since we found clinical responses with doses below the highest one, we routinely set 2 million cells/kg as target for single doses. As shown in Table 1, patient UPN5 received a total of 70 doses, adding up more than 2 billion cells and 2.6×10^{14} viral particles. These numbers of viral particles have not been previously administered in humans with so mild toxicity. It is not currently known either the optimum dosage or the dosing schedule of oncolytic viruses in the clinic, but our experience indicates that the use of mesenchymal cells may be a strategy for increasing the amount of oncolytic virus administered to patients avoiding or minimizing dose limiting toxicities.

In vivo detection of the virus genome days after CELYVIR infusion was an indirect confirmation of the replicative capacity of the infused adenovirus. The presence of ICOVIR-5 was documented by PCR in all patients. By the time the samples were drawn, the detection of the viral DNA should correspond to the *in vivo* secondary infection of tumor cells and suggested that CELYVIR carried ICOVIR-5 to areas with metastases.

We had some clinical responses among the children treated with CELYVIR. This confirmed our first report [7] and allowed us to search for markers that may help in improving our capacity for identifying patients who may benefit from this therapy. We reasoned that

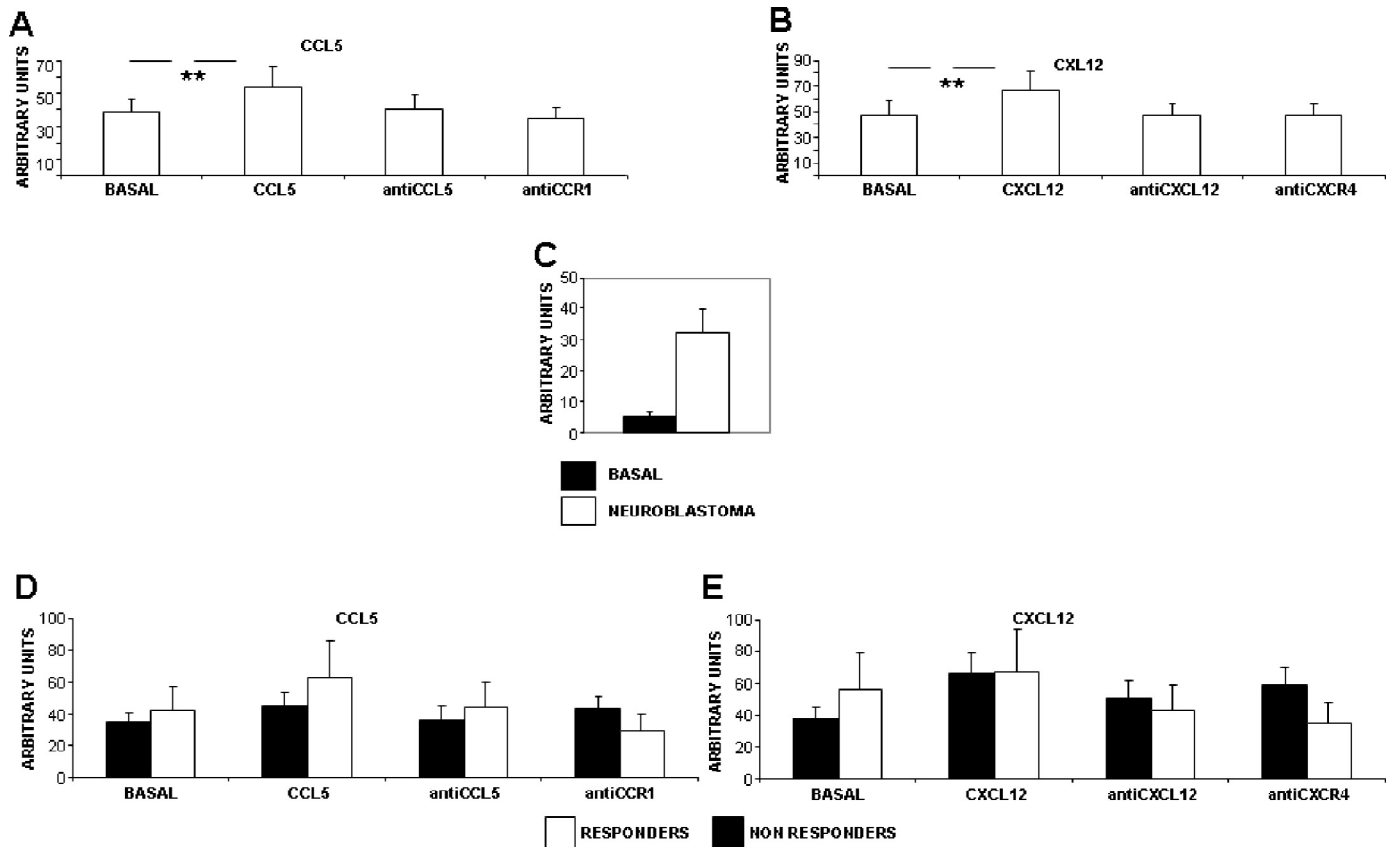


Fig. 4. Mesenchymal stem cells in the CELYVIR products responded to chemotactic stimuli. Results of migration of the CELYVIR product in transwell assays. The lower chambers of the transwell systems were prepared with CCL5 (A), CXCL12 (B), either alone or plus the corresponding blocking antibodies; or a neuroblastoma cell line (C). (D and E) Results of migration of the CELYVIR product in transwell assays from patients who responded (white bars) and patients who did not (black bars). The lower chambers of the transwell systems were prepared with CCL5 (D) or CXCL12 (E), or the corresponding blocking antibodies. ** $p < 0.01$.

several factors may influence the achievement of a response in our strategy: the capacity of carrier cells for targeting metastatic sites, the oncolytic death of tumor cells *in vivo* and the role of the immune system in the success of oncolytic virotherapies. Even though sample size limited the power of statistic comparisons in this cohort of patients, we found patterns and tendencies that are interesting to be analyzed.

The migration and homing capacities of carrier MSCs in CELYVIR are likely linked to the profile of cell adhesion molecules they express and may enable them to migrate toward the sites of metastasis. We hypothesized that an optimum profile should result in better clinical outcomes. We performed an extensive study of cell adhesion molecules expressed by the MSCs used to treat our patients and compared the level of expression of responders versus non responders.

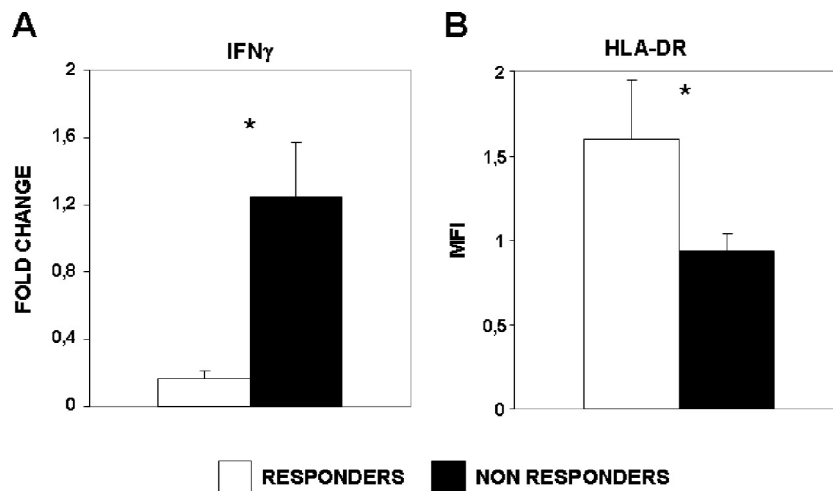


Fig. 5. Mesenchymal stem cells in the CELYVIR products from patients who responded expressed higher levels of immune molecules. (A) Relative expression levels of the IFN γ mRNA determined by RTqPCR. (B) The expression level of HLA-DR was calculated by the mean fluorescence intensity by flow cytometry and normalized to the corresponding isotype. Patients who responded, white bars; non-responder patients, black bars. * $p < 0.05$.

Of all the molecules studied, 2 chemokine receptors, CCR1 and CXCR1, were expressed at significantly different levels comparing both groups of patients. Other authors have shown that CXCR1 enhances the ability of human MSC to migrate toward gliomas [13] and both CXCR1 and CCR1 increase the migration of MSCs into sites of degenerated tissue of myocardium [14,15]. In every case, the levels of the chemokine receptors in MSC were higher among the responders, suggesting a better capacity for migrating toward sites where the corresponding chemokine is produced. The migration capacity of the cells was corroborated in transwell assays, either with single stimuli or with a NB cell line as source of chemotactic stimuli, demonstrating the capacity of the MSCs in CELYVIR for responding toward the ligands of these receptors. For CXCR4, the differences were almost statistically significant, an interesting finding since NB is known to metastasize to the bone marrow, and the axis CXCR4–CXCL12 is involved in the homing of hematopoietic stem cells [16] and MSCs [17] into the bone marrow upon transplantation, and also in the homing of MSCs into tumors [18]. The *in vivo* source of the corresponding chemokines in our patients was not studied; however, it has been reported that NB cells produce IL-8 (ligand of CXCR1) [19]. An alternative source of chemokines is the tumor microenvironment, which favor immune cell recruitment and angiogenesis [20]. In addition, many of the ligands for these receptors are associated to inflammation, a process related to cancer. Alternatively, the organs where NB cells naturally metastasize may be the source of the chemokine, as it has been commented previously for CXCL12. These molecules may also promote the growth and survival of neuroectodermal tumor cells [21].

MSC lethal irradiation, a requirement of our regulatory agency, may diminish the potential capacity of MSCs as carrier cells in virotherapy. Irradiation induces senescence [22], apoptosis [23] and autophagy [24] in MSC. We studied the impact of lethal irradiation on the migration capacity of CELYVIR and found a negative effect. Our results suggest that irradiation may jeopardize their *in vivo* performance and the clinical benefits that might be associated to their migratory ability upon infusion.

The immune system has a recognized role in the outcome of virotherapies [25]. Our results indicated that the status of the patient's immune system at the moment of initiating therapy might be crucial for achieving a clinical benefit. More specifically, the numbers of T lymphocytes might need to be above a threshold, since patients who did not respond in our cohort had significantly less circulating T cells than patients who did respond. We did not find a comparable result for other leukocytes, such as B cells (adaptive immunity) or NK cells, neutrophils and monocytes (innate immunity) underscoring the value of T lymphocytes in the antitumor immune attack after virotherapy. Therefore, although an immune response seems universal among these patients, only those with a presumably diverse enough TCR repertoire (highly enough T cell numbers) may develop a clinically significant antitumor immune response. In accordance with this, it is interesting that the numbers of naïve T cells pre-therapy were significantly higher in the group of patients who responded. We also found data suggesting an immune response upon administration of virus, since the numbers of circulating lymphocytes raised from basal levels in all patients. The increase was more important among patients who did not respond to CELYVIR. The kinetic of memory subsets in CD4 and CD8 T lymphocytes during therapy among the non-responders strongly suggested an antiviral immune response. The CCR7^{neg} memory T cell subpopulations are enriched in cells with effector molecules (IFN- γ and perforin), with homing preference into inflamed peripheral tissues, while the CD45RA⁺CCR7⁻ population is defined as a terminally (or late) differentiated population of effector T cells [26]. In several viral infections in humans, the numbers of helper and cytotoxic T lymphocytes with effector phenotypes increased along the expansion and resolution phases of the disease [27]; therefore, the

increase of EM and EMRA subsets during therapy may reflect the immune response to the continuous viral antigenic presentation. On the contrary, changes in circulating immune cell numbers were very mild in the group of responder patients, which might suggest a less active antiadenoviral response. In the only patient with available tumor biopsies, the clinical response was associated to activation of TILs, as shown by the Ki67 immunohistochemistry results of primary samples. The trials with a GM-CSF armed vaccinia oncovirus [28] and with a GM-CSF armed herpes oncovirus [29] in humans have detected infiltration of tumors by immune cells, both at injected and non-injected lesions. In accordance with the results in humans, studies in mice [30,31] found that localized intratumoral therapy with oncolytic viruses induced inflammatory responses, which activated lymphocytic infiltration and antitumor effect without virus spread in distant tumors (not injected with the virus). The authors hypothesized that high levels of viral replication were not needed to reach the effect, and the inflammation coincided with tumor infiltration with T CD4 and CD8 TILs. We have observed similar results using ICOVIR-5 in an immunocompetent murine model [32]. These results demonstrate that localized therapy with oncolytic virus can activate an immune inflammatory infiltration in tumors. It is not yet known whether the effect of virotherapy is direct on the lymphocytes or may also act through downmodulating the tolerant tumor microenvironment.

MSCs have a well known role in human antigen presenting cells [33–36] and effector and regulatory leukocytes of the innate and adaptive responses [37–40]. In our strategy, MSCs may not only act as carrier cells but might as well modulate the immune responses taking place after CELYVIR infusions, i.e., the antiadenoviral and the antitumor immune responses. We studied several molecules that may have impact in the role of MSCs in immune responses. From our gene expression assays, it appeared that clinical responses were achieved when the MSCs presented a lower pro-inflammatory profile after adenoviral infection (significantly lower expression of IFN γ , and a trend toward lower levels of IL6, IL8, IDO and VEGF α). In addition, expression of HLA class II by the same MSCs correlated with a better clinical outcome. It is not easy to draw a clear conclusion with these results and the fact that inflammation may favor the benefit of virotherapies. It may be argued that our studies were not done with the MSCs *in situ*, and it is known that MSCs modulate their gene and protein expression profile depending on the environment in which they are placed [41]. Another factor is the fact that MSCs were lethally irradiated in our strategy, a manipulation that deeply affected the function of these cells, although it has been reported that irradiated MSCs do not lose their immunomodulatory abilities [42]. In any case it is tempting to speculate that a lower antiadenoviral response would be a requisite for obtaining clinical benefits in our strategy, based on two observations. First, autologous MSCs from responder patients showed a less inflammatory gene expression profile after ICOVIR5 infection, compared to MSCs from non-responders, indicating a lower cellular response against adenovirus. Second, non-responder patients increased their peripheral blood cell counts and the proportions of terminally differentiated effector T lymphocytes during CELYVIR treatment in contrast to responders. We observed similar effects using a canine CELYVIR treatment in dogs with spontaneous tumors (Cejalvo et al., manuscript in preparation). Taken together these data would suggest an inverse correlation between clinical benefits and antiadenoviral immune system activation. In this scene, MSCs from patients who responded to adenovirus with a non-proinflammatory or tolerogenic profile might hide the virus from the recognition and attack of the innate and adaptive immune systems before and after CELYVIR deliver their load at the metastasis, favouring better conditions for the *in situ* oncolytic effect. Once the MSCs have eventually disappeared from the scene, the increased oncolysis that would ensue should increment the chances for the initiation or reactivation of

an antitumor immune response. In addition, these data would suggest that adenoviral immunodominance is lower among responder patients. The immunodominance hypothesis proposes that a strong immune response against dominant viral antigens prevents the development of an efficacious immune response against tumor antigens [43]. If so, a thorough understanding of why some patients present a lower adenoviral immunodominance would be essential to understand the therapeutic effects of CELYVIR.

In conclusion, our results confirm that the use of mesenchymal progenitor cells carrying an oncolytic adenovirus is a safe procedure in treating children with advanced NB, which can be administered in a multidose protocol with very high quantities of virus and an excellent tolerance. Our work has limitations due to the small sample size, the lack of direct data on the homing of CELYVIR and of the antiadenoviral and antitumor activities after therapy, all of them inherent to any trial of this type. Nevertheless, based on our results we suggest that the presence of MSCs in the medicine product may have an impact in the response to the therapy beyond their role as cell carriers. Several characteristics of the MSCs, related to their migratory capacities and response to the viral infection, may help us in designing an optimum version of this new antitumor strategy. Taking into account the patients' outcome and our experimental results, we envision that the development of an improved version of CELYVIR could bring into play a MSC source specifically selected on the basis of the characteristics we have already seen that are probably keys in a putative responder-like phenotype (e.g. immunophenotype, migration ability, non-irradiated).

Funding

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias PI08/0029 and PI14CIII/00005 to JGC and PI13/02487, EC11-061 and EC07/90591 to MR; RTICC RD12/0036/0027 to JGC; and the Madrid Regional Government (S-BIO-0204-2006, MesenCAM; P2010/BMD-2420, CellCAM) to JGC and MR. MR is supported by Asociación Pablo Ugarte and by Asociación NEN.

Conflict of interest

The authors declare there are no conflicts to disclose.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.canlet.2015.11.036.

References

- [1] B.D. Lichty, C.J. Breitbach, D.F. Stojdl, J.C. Bell, Going viral with cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer* 14 (2014) 559–567.
- [2] G.K. Friedman, Attack of the cancer-killing viruses: clinical application of oncolytic virotherapy in children, *Blood Cancer* 62 (2015) 739–740.
- [3] R.C. Hoeben, D. Louz, D. Koppers-Lalic, Biosafety of non-human therapeutic viruses in clinical gene therapy, *Curr. Gene Ther.* 13 (2013) 492–499.
- [4] M.J. Atherton, B.D. Lichty, Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment, *Immunotherapy* 5 (2013) 1191–1206.
- [5] F.J. Zemp, B.A. McKenzie, X. Lun, K.M. Reilly, G. McFadden, V.W. Yong, et al., Cellular factors promoting resistance to effective treatment of glioma with oncolytic myxoma virus, *Cancer Res.* 74 (2014) 7260–7273.
- [6] K.W. Peng, R. Myers, A. Greenslade, E. Mader, S. Greiner, M.J. Federspiel, et al., Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses, *Gene Ther.* 20 (2013) 255–261.
- [7] J. García-Castro, R. Alemany, M. Cascalló, J. Martínez-Quintanilla, M. Arriero Mdel, A. Lassaletta, et al., Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study, *Cancer Gene Ther.* 17 (2010) 476–483.
- [8] M. Cascallo, M.M. Alonso, J.J. Rojas, A. Perez-Gimenez, J. Fueyo, R. Alemany, Systemic toxicity-efficacy profile of ICovIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway, *Mol. Ther.* 15 (2007) 1607–1615.
- [9] M.M. Alonso, M. Cascallo, C. Gomez-Manzano, H. Jiang, B.N. Bekele, A. Perez-Gimenez, et al., ICovIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo, *Cancer Res.* 67 (2007) 8255–8263.
- [10] A. Pérez-Martínez, M. González-Vicent, J. Valentín, E. Aleo, A. Lassaletta, J. Sevilla, et al., Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia, *Bone Marrow Transplant.* 47 (2012) 1419–1427.
- [11] W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, et al., CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 1701–1711.
- [12] T.C. Liu, E. Galanis, D. Kirn, Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4 (2007) 101–117.
- [13] S.M. Kim, D.S. Kim, C.H. Jeong, D.H. Kim, J.H. Kim, H.B. Jeon, et al., CXCR4 chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407 (2011) 741–746.
- [14] J. Xu, Q. Chen, C. Shi, Z. Yin, Overexpression of CXCR1/CXCR2 on mesenchymal stromal cells may be an effective treatment for acute myocardial infarction, *Cytotherapy* 11 (2009) 990–991.
- [15] J. Huang, Z. Zhang, J. Guo, A. Ni, A. Deb, L. Zhang, et al., Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium, *Circ. Res.* 106 (2010) 1753–1762.
- [16] D.E. Wright, E.P. Bowman, A.J. Wagers, E.C. Butcher, I.L. Weissman, Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1145–1154.
- [17] R.F. Wynn, C.A. Hart, C. Corradi-Verini, L. O'Neill, C.A. Evans, J.E. Wraith, et al., A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow, *Blood* 104 (2004) 2643–2645.
- [18] S. Lourenco, V.H. Teixeira, T. Kalber, R.J. Jose, R.A. Floto, S.M. Janes, Macrophage migration inhibitory factor-CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors, *J. Immunol.* 194 (2015) 3463–3474.
- [19] J. Qiao, J.H. Kang, J. Cree, B.M. Evers, D.H. Chung, Ets1 transcription factor mediates gastrin-releasing peptide-induced IL-8 regulation in neuroblastoma cells, *Neoplasia* 9 (2007) 184–191.
- [20] R. Somasundaram, D. Herlyn, Chemokines and the microenvironment in neuroectodermal tumor-host interaction, *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 92–96.
- [21] N. Gross, R. Meier, Chemokines in neuroectodermal cancers: the crucial growth signal from the soil, *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 103–110.
- [22] J. Cmielova, R. Havelk, T. Soukup, A. Jiroutová, B. Visek, J. Suchánek, et al., Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments, *Int. J. Radiat. Biol.* 88 (2012) 393–404.
- [23] Á.M. Prendergast, S. Cruet-Hennequart, G. Shaw, F.P. Barry, M.P. Carty, Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation, *Cell Cycle* 10 (2011) 3768–3777.
- [24] N. Fekete, A. Erle, E.M. Amann, D. Fürst, M.T. Rojewski, A. Langonné, et al., Effect of high-dose irradiation on human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells, *Tissue Eng. Part C Methods* 21 (2015) 112–122.
- [25] A. Melcher, K. Parato, C.M. Rooney, J.C. Bell, Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide, *Mol. Ther.* 19 (2011) 1008–1016.
- [26] F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, A. Lanzavecchia, Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* 401 (1999) 708–712.
- [27] F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 745–763.
- [28] J. Heo, T. Reid, L. Ruo, C.J. Breitbach, S. Rose, M. Bloomston, et al., Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer, *Nat. Med.* 19 (2013) 329–336.
- [29] H.L. Kaufman, S.D. Bines, OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma, *Future Oncol.* 6 (2010) 941–949.
- [30] D. Zamarin, R.B. Holmgaard, S.K. Subudhi, J.S. Park, M. Mansour, P. Palese, et al., Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 226ra32.
- [31] S. Tähtinen, S. Grönberg-Vähä-Koskela, D. Lumen, M. Merisalo-Siikkeli, M. Siurala, A.J. Airaksinen, et al., Adenovirus improves the efficacy of adoptive T-cell therapy by recruiting immune cells to and promoting their activity at the tumor, *Cancer Immunol. Res.* 3 (2015) 915–925.
- [32] E. Rincon, D. Kanojia, B. Auffinger, I. Ullay, Y. Han, R. Alemany, et al., Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in combination with oncolytic adenoviruses for the treatment of solid tumors in an immunocompetent mouse model (P2020), *J. Immunol.* 190 (2013) (Meeting Abstract Supplement); 214.11.
- [33] S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, et al., Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, *Blood* 105 (2005) 2214–2219.
- [34] X.X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S.X. Zhang, Y. Wu, X.D. Yu, et al., Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood* 105 (2005) 4120–4126.
- [35] Y.P. Li, S. Paczesny, E. Lauret, S. Poirault, P. Bordignon, F. Mekhloufi, et al., Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to

- differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway, *J. Immunol.* 180 (2008) 598–608.
- [36] B. Zhang, R. Liu, D. Shi, X. Liu, Y. Chen, X. Dou, et al., Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population, *Blood* 113 (2009) 46–57.
- [37] G.M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2, *Blood* 111 (2008) 1327–1333.
- [38] M.M. Duffy, T. Ritter, R. Ceredig, M.D. Griffin, Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways, *Stem Cell Res. Ther.* 2 (2011) 34.
- [39] M. Shi, Z.W. Liu, F.S. Wang, Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells, *Clin. Exp. Immunol.* 164 (2011) 1–8.
- [40] S. Tabera, J.A. Pérez-Simón, M. Díez-Campelo, L.I. Sánchez-Abarca, B. Blanco, A. López, et al., The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes, *Haematologica* 93 (2008) 1301–1309.
- [41] M.E. Bernardo, W.E. Fibbe, Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation, *Cell Stem Cell* 13 (2013) 392–402.
- [42] A.V. de Andrade, J. Riewaldt, R. Wehner, M. Schmitz, M. Odendahl, M. Bornhäuser, et al., Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2014) 1184–1193.
- [43] J.W. Yewdell, Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses, *Immunity* 25 (2006) 533–543.

Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes

A.L. Luis¹, M. Espinoza¹, L. Franco², A. González-Murillo², G.J. Melen², J.C. Ollero Fresno¹, L. Madero², M. Ramírez²

¹Cirugía Pediátrica, ²Oncohematología. Hospital Universitario Infantil Niño Jesús. Madrid.

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar un modelo animal de neuroblastoma (NB) que posibilite estudios relacionados con la inmunidad tumoral.

Material y métodos. Se utilizaron dos tipos de células NB. La línea 36769 procedía del ratón TH-MYCN⁺ en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosin hidroxilasa de rata. La línea 4040 procedía de ratones TH-MYCN⁺/ALK⁺, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

De cada tipo celular se implantaron 1x10⁶ neuroesferas en ratones 129/SVJ (mismo fondo genético que los donantes, n=8), mediante inyección ortotópica en glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, a través de laparotomía transversa supraumbilical. Se realizó seguimiento clínico diario postquirúrgico de los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas.

La presencia de tumor se confirmó macroscópicamente. La pieza tumoral se extirpó y se procesó para estudios de inmunidad celular y mediadores moleculares de tolerancia. Se investigó la existencia de metástasis por citometría de flujo en bazo, médula ósea y sangre periférica.

Resultados. 1) En todos los ratones trasplantados se generó NB ortotópico. 2) La pieza tumoral se encontró infiltrada por diversas subpoblaciones inmunes, con inmunofenotipo efector, regulador y supresor, similar a la situación descrita en los NB humanos. Además, los mediadores moleculares del microambiente apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

Conclusiones. La implantación ortotópica de neuroesferas NB en ratones singénicos nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral.

PALABRAS CLAVE: Neuroblastoma; Modelo preclínico; Transgénico; Singénico; Inmunoterapia.

Correspondencia: Dra. Ana Lourdes Luis Huertas. Hospital Universitario Niño Jesús. Servicio de Cirugía Pediátrica. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009 Madrid.
E-mail: analluiscp@gmail.com

Este trabajo ha sido financiado con Fondos Públicos por: el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI/02487; EC11-061, y EC07/90591), y del Gobierno de la Comunidad de Madrid (S-BIO-0204-2006, MesenCAM; P2010/BMD-2420, CellCAM).

Otras financiaciones: Asociación Pablo Ugarte (Lucha Cáncer Infantil) y Asociación NEN (Asociación de padres, familiares y amigos de Niños Enfermos con Neuroblastoma).

Recibido: Mayo 2016

Aceptado: Diciembre 2016

ESTABLISHMENT OF A PRECLINICAL NEUROBLASTOMA MODEL IN IMMUNOCOMPETENT MICE

ABSTRACT

Aim. To develop a NB animal model which makes possible studies related to tumor immunity.

Materials and methods. Two types of NB cells were used. Cell line 36769 was derived from TH-MYCN⁺ mouse in which overexpression of the MYCN gene is governed by rat tyrosine hydroxylase promotor. Cell line 4040 was derived from TH-MYCN/ALK mice, which in addition express an activating mutation of ALK gene.

For each cell type, 1x10⁶ neurospheres were implanted in 129/SVJ mice (with the same genetic background as donors, n=8), via orthotopic injection in the left suprarenal gland by intraperitoneal approach, through a transverse supraumbilical laparotomy.

Daily postsurgical clinical follow-up of the animals was done until they were sacrificed at four weeks.

The tumor presence was macroscopically confirmed. The tumoral sample was excised and was processed for cellular immunity and molecular tolerance mediator's studies.

The existence of metastasis was investigated by flow cytometry in the spleen, bone marrow and peripheral blood.

Results. 1) Orthotopic Neuroblastoma was generated in all the transplanted mice. 2) The tumors were infiltrated by several immune subpopulations, with effector, regulatory and suppressor immunophenotype. This was similar to the immunophenotype described in human NB. Furthermore, the molecular mediators of the environment point to a state of protumoral tolerance.

Conclusion. The orthotopic implantation of NB neurospheres in syngeneic mice has allowed us to generate a NB model in which it has been possible to study the tumor immunity.

KEY WORDS: Neuroblastoma; Preclinical model; Transgenic; Syngeneic graft; Immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la población pediátrica. Su tratamiento supone un reto para oncólogos y cirujanos pediátricos ya que, a pesar de los avances en las terapias de quimioterapia, radioterapia y trasplante de médula ósea, no se han conseguido

mejoras en la supervivencia en la última década, siendo su mortalidad aún cercana al 50% en los grupos de alto riesgo^(1,2).

En el intento de mejorar su supervivencia, se hace necesario el desarrollo de modelos preclínicos de NB, que permitan la investigación de aspectos citogenéticos y moleculares, que ayuden a esclarecer su origen, así como al desarrollo de nuevas terapias avanzadas⁽³⁻⁶⁾.

En este trabajo se describe el establecimiento de un modelo murino de trasplante de NB en un animal inmunocompetente. Dicho modelo posibilita estudios relacionados con la inmunidad tumoral, un campo de vital importancia en la investigación y el desarrollo de tratamientos futuros de inmunoterapia y viroterapia oncolítica en dicho tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: se usaron ratones comprados al repositorio del National Cancer Institute (Frederick, Maryland, EEUU), mantenidos en el Animalario del CIEMAT (Registro Número 28079-21 A), cumpliendo con todas las recomendaciones y las leyes españolas y europeas (FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Laboratorio de Animales en la Ciencia).

Se trasplantaron células de NB procedentes de dos líneas celulares de ratones con NB, en 8 ratones *wild type* (WT) 129/SJV, del mismo fondo genético que los donantes.

La primera línea celular: 36769 ($n=4$), procedía de ratones con NB: TH-MYCN⁺, en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata.

La segunda línea celular: 4040 ($n=4$), se obtuvo de ratones, con NB, TH-MYCN⁺/ALK⁺, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

Ambas líneas fueron cedidas por el Doctor Louis Chesler, del Royal Marsden, Londres.

Las células fueron transducidas con un vector lentiviral EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) con el fin de transformarlas en células fluorescentes que permitiera localizarlas por citometría de flujo en órganos periféricos y poder determinar la existencia o no de metástasis.

Las neuroesferas de NB de cada línea celular se cultivaron en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con B27 sin vitamina A (Gibco), mFGF (*murine Fibroblastic Growth Factor*: 40 ng/ml, R&D Systems), mEGF (*murine Epidermic Growth Factor*: 20 ng/ml, R&D Systems) y 1% penicilina-estreptomycin (Gibco). Las células se mantuvieron a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general mediante inyección subcutánea de ketamina (50 ng/g), utilizando atipamezol (2,5 ng/g) como reversor anestésico postquirúrgico.

De cada tipo celular, se implantaron 1×10^6 neuroesferas en los ratones WT 129/SJV mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal izquierda, por abordaje intraperitoneal a través de laparotomía transversa supraumbilical. Para el acce-

so a la región retroperitoneal y zona suprarrenal, se exteriorizó la cámara gástrica y asas de intestino delgado, y se desplazó el bazo hacia la línea media. Se utilizaron suturas absorbibles de 7/0 para la ligadura de sangrados capilares puntiformes en el mesenterio o en la pared abdominal. Tras la confirmación de una adecuada hemostasia, se procedió al cierre de la cavidad abdominal por planos, con suturas absorbibles de 6/0 y 5/0. Se realizó una sutura intradérmica con material absorbible de 5/0 para el cierre del plano cutáneo.

Se hizo seguimiento clínico diario postquirúrgico de todos los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas de la inyección, realizándose posteriormente la necropsia mediante el mismo abordaje quirúrgico intraabdominal al descrito en el proceso del implante, en todos los casos.

Se valoró la existencia de tumor mediante estudio anatómico macroscópico de la cavidad abdominal.

Se realizó extirpación de la glándula suprarrenal izquierda, y parte de la pieza tumoral se fijó en formaldehído (10%) y se incluyó en parafina, para la posterior tinción con hematoxilina-eosina (HE) para el estudio anatomopatológico microscópico en microscopio de luz.

El resto del tumor se procesó para la detección del infiltrado leucocitario (CD45⁺) y estudio de las subpoblaciones linfocitarias mediante la realización de citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) y para el estudio de la expresión génica de mediadores moleculares del microambiente tumoral: *CTLA-4* y *PD-1*, mediante qRT-PCR (*"quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction"*).

Por último, se realizó citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) en bazo, médula ósea y sangre periférica para la investigación de metástasis.

RESULTADOS

En todos los casos ($n=8$) se consiguió el implante celular sobre la glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, mediante laparotomía transversa izquierda en 6/8 animales, y ampliada a línea media en los 2/8 casos restantes.

En todos los procedimientos se observó la existencia de un "habón" sobre la glándula suprarrenal durante la inyección, sin objetivarse extravasaciones a cavidad abdominal, por lo que no se requirieron inyecciones adicionales en ningún caso. No se observaron complicaciones hemorrágicas, ni lesiones de órganos vecinos durante los implantes suprarrenales. Los 8 ratones sobrevivieron al trasplante ortotópico de células de neuroblastoma. No se constató ningún caso de hemorragia intraabdominal, como complicación postoperatoria, confirmando un curso postoperatorio favorable en todos los animales, durante las 4 semanas de seguimiento.

En el momento del sacrificio, se confirmó un buen estado clínico de los ratones, y en ningún caso se palpó tumoración abdominal o en el dorso, en la zona lumbar. La herida quirúrgica presentaba buen aspecto, sin signos de infección, y con reabsorción de la sutura en 7/8 casos. En un ratón se observó

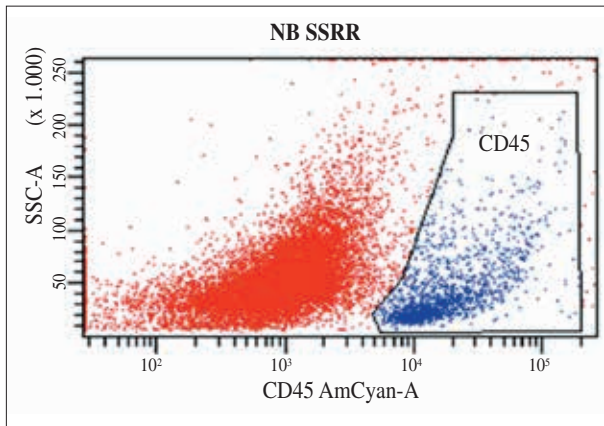


Figura 1. Imagen que muestra la cuantificación de las subpoblaciones inmunitarias CD45, mediante citometría de flujo. Disgregado celular tumoral procedente de tumor suprarrenal izquierdo extraído de un ratón del grupo 4040 TH-MYCN⁺/ALK⁺.

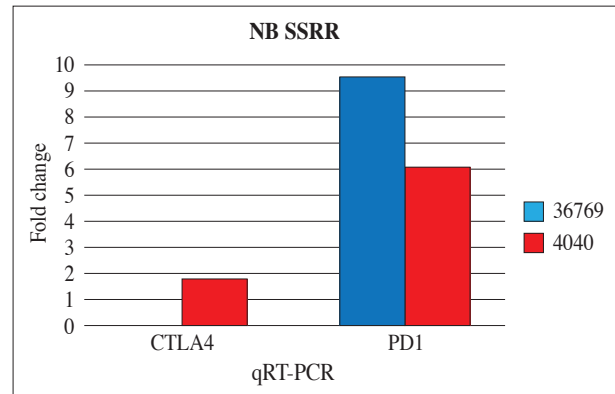


Figura 2. Gráfico en el que se representan los niveles de expresión génica de las moléculas CTLA-4 y PD-1 del microambiente tumoral, mediante cuantificación con qRT-PCR. Se demuestra expresión génica de CTLA-4 en la línea 4040-THMYCN⁺/ALK⁺, y del receptor PD-1 en ambas líneas celulares: 4040-THMYCN⁺/ALK⁺ y 36769-THMYCN⁺.

una pequeña dehiscencia superficial en el margen lateral de la incisión, con un adecuado cierre de los planos profundos de la pared abdominal.

En todos los casos se confirmó macroscópicamente la existencia de tumor en la glándula suprarrenal izquierda, observando masas de mayores dimensiones y más vascularizadas en el grupo en el que se implantó la línea celular 4040; evidenciándose extensión retroperitoneal hasta la línea media en 3 de ellos.

No se evidenciaron lesiones sospechosas de NB en ningún otro órgano abdominal en el estudio anatómico macroscópico.

Los estudios anatomopatológicos microscópicos confirmaron la existencia de neuroblastoma en todas las piezas tumorales extirpadas, consistentes en infiltraciones de neuroblastos en distinto grado de diferenciación neuronal con escaso estroma schwanniano y alto índice de cariorrexis.

La citometría de flujo demostró infiltración leucocitaria tumoral en todos los tumores. La figura 1 muestra un ejemplo de la cuantificación del infiltrado inmune de los tumores.

Se detectó un número ínfimo de células tumorales en médula ósea y sangre periférica en todos los ratones trasplantados, y en bazo, en 2/4 de los animales del grupo 4040-TH-MYCN⁺.

Se detectaron niveles de expresión génica de PD-1 en todos los tumores, y de CTLA-4 en los generados a partir de la línea celular 4040; como muestra la figura 2.

DISCUSIÓN

El NB, uno de los tumores más frecuentes entre la población pediátrica, cuenta aún con una mortalidad inaceptable en los casos metastásicos, a pesar de la aplicación de nuevos protocolos de quimioterapia, radioterapia o trasplante de médula ósea. La constatación de la aparición de “tolerancias” a

estos tratamientos, o la elevada toxicidad de los mismos en muchos casos, crea la necesidad del desarrollo de terapias innovadoras complementarias, con otros mecanismos de acción, muy específicos, que minimicen estos riesgos. En este sentido, los tratamientos de inmunoterapia, basados en la activación de la respuesta inmune antitumoral del paciente, han sido ya probados con éxito en muchos tumores en adultos^(3,4,7).

En búsqueda de estas nuevas terapias oncológicas en el NB, es necesario el desarrollo de modelos experimentales que permitan la investigación de aspectos genéticos, inmunitarios o moleculares, involucrados en la etiopatogenia del tumor, así como el estudio de posibles cambios a estos niveles ante la aplicación de tratamientos en las fases preclínicas del desarrollo de nuevos fármacos de futura aplicación en los pacientes⁽⁷⁻⁹⁾.

En este sentido, se dividen en dos grupos principales los modelos animales de NB utilizados en la actualidad: los modelos genéticos y los modelos de trasplante de células de neuroblastoma.

Dentro del primer grupo, se ha desarrollado ampliamente en los últimos 15 años el modelo TH-MYCN: modelo murino transgénico de NB, que reproduce las características genéticas y clínicas del NB de alto riesgo con amplificación de N-MYC, del humano⁽⁷⁻¹¹⁾. Consiste en la obtención de ratones transgénicos TH-MYCN⁺ en los que la expresión del oncogén n-MYCN está controlada por el promotor del gen de la tirosina-hidroxilasa de la rata, con expresión selectiva en las células precursoras neuronales de origen simpaticoadrenal. Son ratones con tumores espontáneos, de localización en los ganglios de la cadena simpática paraespinal o periadrenal, pero con escasa tendencia a la diseminación metastásica. Histológicamente, se corresponden con tumores con escaso estroma schwanniano y alto índice mitótico, características compartidas con los pacientes con NB metastásicos con amplificación de n-MYC, y con los tumores obtenidos en estos animales.



Figura 3. Imagen que muestra necropsia de ratón perteneciente al grupo 4040 TH-MYCN+/ALK+. El asterisco (*) señala el tumor retroperitoneal originado a partir de la implantación suprarrenal izquierda de 1×10^6 neurosfers de la línea celular 4040 TH-MYCN+/ALK+.

La principal ventaja de este modelo es la generación de tumores de forma espontánea, en un microambiente tisular y tumoral “adecuado” por asentarse en las localizaciones habituales, y lo más importante, en un huésped inmunocompetente, lo que permite la investigación de aspectos inmunitarios en el tumor o su microambiente^(12,13).

Entre las limitaciones más destacadas se encuentran: la escasa localización adrenal, la escasa tendencia metastásica o la baja ratio de generación tumoral, con una penetrancia variable según los fondos genéticos.

En el intento de obviar estas desventajas, han surgido recientemente los modelos de trasplante de líneas celulares de NB, que permiten la generación de tumores en un menor período de tiempo, con mayor número de animales, al no depender de la generación espontánea del tumor. Dentro de este grupo, se han desarrollado distintas opciones en función del origen de la línea celular: células de NB humano, o de origen animal; o según la localización del implante: sobre la glándula adrenal (*trasplante ortotópico*), a nivel subcutáneo (*trasplante ectópico*) o infusión de células tumorales en sangre periférica^(14,15).

De todas estas modalidades, la más ventajosa parece la del trasplante *singénico* (células de la misma especie animal y mismo fondo genético) al aplicarse sobre animales immuno-

competentes. También la modalidad *ortotópica* que, aunque de mayor dificultad técnica, permite la generación de tumores de localización adrenal y, por lo tanto, en un microambiente tumoral y tisular apropiados, tal y como se ha demostrado en distintos estudios en los que se han observado tumores de mayores dimensiones, más vascularizados y con diferentes subpoblaciones leucocitarias a los ectópicos de localización subcutánea^(9,16).

Con este trabajo, hemos podido desarrollar este modelo de trasplante *singénico* de NB (ratones donantes y receptores de mismo fondo genético: 129/SVJ) y *ortotópico* (implante en glándula adrenal), de células procedentes del modelo murino transgénico TH-MYCN. Hemos podido generar así los tumores de mayor interés, en las condiciones más deseables en el contexto experimental: NB con amplificación n-MYC, y por lo tanto los más agresivos, suprarrenales, y asentados en huéspedes inmunocompetentes. Estas condiciones nos han permitido el estudio de la infiltración leucocitaria, de la expresión de moléculas participantes de la respuesta inmune antitumoral, o de la interacción entre el tumor y su microambiente^(9,10,12,15,17).

Se pudieron vencer los aspectos de mayor dificultad, como el cultivo y expansión *in vitro* de neurosfers de neuroblastoma siguiendo los protocolos seguidos por otros autores en publicaciones recientes, y que fueron exitosos también en nuestro caso, permitiendo el implante de 1×10^6 células tumorales en cada animal, según se describe en los mismos^(18,19).

En cuanto al procedimiento quirúrgico, se han descrito distintos abordajes: retroperitoneal, intraperitoneal o punciones ecoguiadas, según la experiencia de cada grupo. En nuestro caso, se optó por el abordaje intraperitoneal mediante laparotomía transversa, lo que nos permitió una adecuada y segura accesibilidad, con la consecución de implante celular sobre la glándula suprarrenal, sin complicaciones hemorrágicas, ni daño de órganos vecinos, y con una buena recuperación postquirúrgica en todos los animales.

En relación al estudio de las piezas tumorales, se comprobó que las características histológicas correspondían a las de los tumores metastásicos humanos con amplificación n-myc, y a los descritos en el modelo transgénico THMYCN: con una elevada infiltración neuroblástica, escaso estroma y alto índice mitótico^(11,13).

El estudio celular y molecular de los neuroblastomas, se focalizó en la valoración de existencia de poblaciones celulares inmunes (CD45⁺) mediante citometría de flujo, y en la expresión de moléculas reconocidas como reguladoras del sistema inmune antitumoral (CTLA-4 y PD-1), mediante qRTPCR, siguiendo el segundo objetivo de nuestro estudio, en relación a la investigación de la inmunidad tumoral^(10,17,20).

Este interés se basó en el hecho de que el conocimiento de la respuesta inmunitaria en el neuroblastoma, mediante el estudio de las poblaciones celulares del sistema inmune que pueblan el tumor, es vital para el desarrollo de tratamientos que potencian esta inmunidad antitumoral “natural”, como la viroterapia oncolítica o la inmunoterapia adoptiva mediante la infusión de TILS (*tumor infiltrating lymphocytes*), y que se

incluyen dentro de las principales líneas actuales de investigación en el tratamiento del neuroblastoma^(3,5,21,22).

Por otro lado, la demostración de la importancia del microambiente tumoral en el estado de esta respuesta inmune, mediante la expresión de moléculas que modulan pasos críticos del ciclo inmune en el cáncer, ha promovido la investigación de tratamientos reguladores de la función de estos mediadores, como CTLA-4 que inhibe la activación (“*priming*”) de los linfocitos T, o el receptor PD-1: que disminuye su respuesta citotóxica en el tumor. Estas terapias denominadas “*check-point inhibitors*”, se incluyen junto a la inmunoterapia, en las denominadas “*targeted therapies*” (“*terapias diana*”), que son objeto primordial de la investigación actual en el tratamiento del neuroblastoma o de otros tumores en niños y adultos^(6,20,23,24).

La necesidad de investigaciones sobre el sistema inmunitario en el NB, como en otros tumores pediátricos, se justifica además, por la peculiaridad de que las mutaciones o cambios epigenéticos que influyen en su etiopatogenia y pronóstico, acontecen en un corto período de tiempo, en muchos casos en la etapa intrauterina y, por lo tanto, en pacientes con un sistema inmune aún “virgen”, a diferencia de lo que ocurre en adultos en los que en el origen del cáncer influyen mutaciones ocurridas a lo largo de los años, en el contexto de un sistema inmunitario “sensibilizado” con multitud de antígenos. Ante esta situación, es probable que la función inmune o los factores que la regulan, como los que influyen en su interacción con el microambiente del tumor, sean diferentes en los tumores pediátricos con respecto a los de adultos, y justifiquen en cierta medida la distinta respuesta a las diferentes modalidades de inmunoterapia en una u otra población⁽²³⁾.

Es importante señalar también, en relación al interés del estudio del inmunofenotipo tumoral, la influencia de las características del infiltrado inmune tumoral en la respuesta a ciertos tratamientos de inmunoterapia. Así, se ha visto que los tratamientos anti-PD-1 son eficaces solo en aquellos tumores en los que hay una importante infiltración de linfocitos T citotóxicos, demostrándose refractariedad a los mismos en los que existe poca infiltración de esta subpoblación linfocitaria^(6,25).

Uno de los aspectos de discusión en los experimentos publicados sobre trasplante de líneas celulares de NB es precisamente la distinta agresividad tumoral en cuanto al crecimiento local y vascularización; o diferencias en el inmunofenotipo y expresión molecular tumoral y de su microambiente, en función del distinto tipo de línea celular tumoral^(9,14). En cierto modo, hemos podido detectar a nivel anatómico estas diferencias, ya que se evidenciaron neuroblastomas de mayores dimensiones y más vascularizados, en los ratones trasplantados con la línea celular 4040 THMYCN⁺/ALK⁺⁽²⁶⁾.

Como conclusión, y basándonos en nuestros resultados, podemos concluir que la implantación ortotópica de neuroferas de NB en ratones singénicos inmunocompetentes nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral y mediadores moleculares del microambiente que apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Louis Chesler, Royal Marsden NHS Foundation Trust, London.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 289-97.
2. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3286-92.
3. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2202-11.
4. Moreno L, Chesler L, Hargrave D, Eccles SA, Pearson AD. Pre-clinical drug development for childhood cancer. *Expert Opin Drug Discov*. 2011; 6: 49-64.
5. Ramirez M, Garcia-Castro J, Alemany R. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med*. 2010; 10: 387-93.
6. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br J Haematol*. 2013; 162: 313-25.
7. Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov*. 2015; 10: 53-62.
8. Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 245-55.
9. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One*. 2011; 6: e19133.
10. Cheng AJ, Cheng NC, Ford J, Smith J, Murray JE, Flemming C, et al. Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1467-75.
11. Moore HC, Wood KM, Jackson MS, Lastowska MA, Hall D, Imrie H, et al. Histological profile of tumours from MYCN transgenic mice. *J Clin Pathol*. 2008; 61: 1098-103.
12. Robinson M, Li B, Ge Y, Ko D, Yendluri S, Harding T, et al. Novel immunocompetent murine tumor model for evaluation of conditionally replication-competent (oncolytic) murine adenoviral vectors. *J Virol*. 2009; 83: 3450-62.
13. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J*. 1997; 16: 2985-95.
14. Daudigeos-Dubus E, L LED, Rouffiac V, Bawa O, Leguerney I, Opolon P, et al. Establishment and characterization of new orthotopic and metastatic neuroblastoma models. *In Vivo*. 2014; 28: 425-34.
15. Khanna C, Jaboin JJ, Drakos E, Tsokos M, Thiele CJ. Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis. *In Vivo*. 2002; 16: 77-85.

16. Kroesen M, Brok IC, Reijnen D, van Hout-Kuijer MA, Zeelenberg IS, Den Brok MH, et al. Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64: 563-72.
17. Pistoia V, Morandi F, Bianchi G, Pezzolo A, Prigione I, Raffaghello L. Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. *Front Oncol.* 2013; 3: 167.
18. Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, et al. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 2014; 9: e86813.
19. Liu QX, Tang JY, Cai JY, Yin MZ, Li BS. The cultivation and identification of tumor stem cells from neuroblastoma derived tumor spheres. *Chin J Cancer.* 2010; 29: 1012-7.
20. Carlson LM, De Geer A, Sveinbjornsson B, Orrego A, Martinsson T, Kogner P, et al. The microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e23618.
21. Melen GJ, Franco-Luzon L, Ruano D, Gonzalez-Murillo A, Alfranca A, Casco F, et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 2016; 371: 161-70.
22. Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm.* 2011; 8: 12-28.
23. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013; 39: 1-10.
24. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2015: 669-82.
25. Kodumudi KN, Siegel J, Weber AM, Scott E, Sarnaik AA, Pilon-Thomas S. Immune Checkpoint Blockade to Improve Tumor Infiltrating Lymphocytes for Adoptive Cell Therapy. *PLoS One.* 2016; 11: e0153053.
26. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2012; 22: 117-30.

Systemic oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal carrier cells modulate tumor infiltrating immune cells and tumor microenvironment in mice with neuroblastoma

Lidia Franco-Luzón¹, África González-Murillo^{2,3,5}, Cristina Alcántara-Sánchez³, Lorena García-García³, Maryam Tabasi³, Ana Luis Huertas⁴, Louis Chesler⁶ and Manuel Ramírez^{2,3,5}

¹Fundación Oncohematología Infantil, Madrid, Spain

²Unidad de Terapias Avanzadas, Oncología, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

³Fundación de Investigación Biomédica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

⁴Servicio de Cirugía, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

⁵Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Madrid, Spain

⁶Paediatric Solid Tumour Biology and Therapeutics Team, Division of Clinical Studies and Cancer Therapeutics Division, The Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK

Correspondence to: Manuel Ramírez, **email:** manuel.ramirez@salud.madrid.org

África González-Murillo, **email:** africa.gonzalez@salud.madrid.org

Keywords: oncolytic virotherapy; neuroblastoma; mesenchymal stem cells; tumor microenvironment; immune response

Received: july, 16, 2019

Accepted: october 21, 2019

Copyright: Franco-Luzón et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Celyvir (autologous mesenchymal cells -MSCs- that carry an oncolytic adenovirus) is a new therapeutic strategy for metastatic tumors developed by our research group over the last decade. There are limitations for studying the immune effects of human oncolytic adenoviruses in murine models since these viruses do not replicate naturally in these animals. The use of xenografts in immunodeficient mice prevent assessing important clinical aspects of this therapy such as the antiadenoviral immune response or the possible intratumoral immune changes, both of tumor infiltrating leukocytes and of the microenvironment. In our strategy, the presence of MSCs in the medicinal product adds an extra level of complexity. We present here a murine model that overcomes many of these limitations. We found that carrier cells outcompeted intravenous administration of naked particles in delivering the oncolytic virus into the tumor masses. The protection that MSCs could provide to the oncolytic adenovirus did not preclude the development of an antiadenoviral immune response. However, the presence of circulating antiadenoviral antibodies did not prevent changes detected at the tumor masses: increased infiltration and changes in the quality of immune cells per unit of tumor volume, and a less protumoral and more inflammatory profile of the tumor microenvironment. We believe that the model described here will enable the study of crucial events related to the immune responses affecting both the medicinal product and the tumor.

INTRODUCTION

Celyvir (autologous mesenchymal cells -MSCs- that carry an oncolytic adenovirus [1] inside) is a new therapeutic strategy for metastatic tumors developed by our research group over the last decade. The first clinical trial with Celyvir [2] for children and adults with metastatic and refractory solid tumors (ClinicalTrials Identifier: NCT01844661; EudraCT2008-000364-16) and a compassionate use program [3] have shown that Celyvir is a very well tolerated treatment, with only mild toxicities related to the adenoviral infusion (fever, chills and discomfort) with the potential to achieve clinical responses in patients with advanced tumors.

Nowadays it is assumed that oncolytic virotherapy can be considered as a form of cancer immunotherapy [4], since the reported clinical benefits have been associated with antitumor immune phenomena initiated by infection and oncolysis. Results of preclinical models and human trials demonstrate that the localized effect of oncolytic viruses is capable of activating an inflammatory immune infiltrate in tumors. This point is of vital importance, since it is known that tumor infiltration by T lymphocytes is a prerequisite for the success of immunotherapies based on inhibitors of immune checkpoints [5]. Oncolytic virotherapy, and therefore Celyvir, appears as a strategy capable of achieving tumor infiltration by lymphocytes in any type of tumor, in principle. In addition to its action on tumor infiltrating leukocytes, oncolytic virotherapies can also act on the tolerant state of the tumor microenvironment [6].

There are limitations for studying the immune effects of human oncolytic adenoviruses in animal models since these viruses do not replicate naturally in murine models. The use of xenografts in immunodeficient mice allows the analysis of aspects related to oncolysis or tumor targeting but no other important clinical facets such as the antiadenoviral immune response or the possible intratumoral immune changes, both of tumor infiltrating leukocytes and of the microenvironment. In addition to the importance of the various immune reactions associated with oncolytic virotherapy, our strategy incorporates the well-known immunomodulatory role of mesenchymal stem cells (MSCs) [7–14]. We have explored the possibility of an immunocompetent murine model of neuroblastoma, a childhood tumor treated with Celyvir by our group. In this model, we comprehensively analyzed biodistribution of Celyvir, adenoviral levels in peripheral blood, antiadenoviral response and intratumor immune changes associated with repeated administrations of an oncolytic adenovirus carried by MSCs. We found that carrier cells outcompeted intravenously (IV) administration of naked particles in delivering the oncolytic virus into the tumor masses. The protection that MSCs could provide to the oncolytic adenovirus did not preclude the development of an antiadenoviral immune response. However, the

presence of circulating antiadenoviral antibodies did not prevent the changes detected at the tumor masses. Therapy caused an increased infiltration and changes in the quality of immune cells per unit of tumor volume when compared to untreated mice. Tumor microenvironment showed a less protumoral and more inflammatory profile after treatment. We believe that the model described here will help us in optimizing this type of therapy by enabling the study of crucial events related to the immune responses affecting both the medicinal product and the tumor.

RESULTS

Mutant oncolytic adenovirus dIE102 replicates efficiently in adipose-derived murine MSC

To generate mCelyvir (murine version for human Celyvir used in the clinical setting [1, 3]), mesenchymal stem cell cultures were obtained from the white adipose tissue of mice, and were characterized by flow cytometry as described in Math & Methods. The oncolytic murine adenovirus MAV-1 dIE102 was previously developed by Dr. Katherine Spindler's group [15]. Murine MSCs (mMSCs) were infected with mAd and viral replication was assessed by quantitative PCR (qRT-PCR). Detection of viral particles in the supernatants collected at days 2 and 7 after infection increased over time (Supplementary Figure 1A, 1B, 1C). The cytopathic effect was followed by daily visual inspection. These findings are similar to those in the human system and allowed us to study the immune effects of murine Celyvir in an immunocompetent model of neuroblastoma.

Changes on adenovirus immunity upon systemic administration of murine celyvir correlated with the presence of mAd particles in PB

Human Celyvir is administered weekly to patients so medicine biodistribution, virus replication and antiviral immune responses are important aspects of this therapy. Tumor bearing mice were treated during 3 weeks with mCelyvir (n=5) or naked virus (n=6) and PB samples were recovered before and one / two days after each treatment aiming at assessing the systemic immune response against the oncolytic virus. A scheme of experimental procedure is represented in Figure 1A. The anti-MAV neutralizing antibodies kinetic in serum showed that all treated mice had a positive titer of specific anti-adenovirus antibody while none of the untreated one did (Figure 1B). Interestingly, antibody levels were not detected until the third dose of either naked mAd or mCelyvir, being higher for the former compared with mCelyvir. Therefore, a systemic humoral immune response against the oncolytic virus followed the repeated administration of mCelyvir.

We also analyzed the presence of mAd virus in PB samples from mice treated with either naked virus or

mCelyvir. Samples from the first week were all negative. mAd genomic sequences were detectable in samples from the second week of treatment. We observed that particles of mAd decreased in both groups from the third week on, being only detectable in mCelyvir condition. Thus, circulating viral particles dropped when the titers of neutralizing anti-MAV1 antibodies raised (Figure 1C).

Anatomical distribution of systemically administered oncolytic adenovirus delivered in carrier mesenchymal stem cells

We assessed the biodistribution of the oncolytic adenovirus after repeated intravenous infusions. The mice of the experiment explained previously were exsanguinated and sacrificed one week after the fourth intravenous dose of either naked mAd or mCelyvir. Several organs and the tumor masses were procured. The administration of the oncolytic adenovirus in carrier cells resulted in higher accumulation of the virus in the tumor masses ($p=0.08$) and lungs ($p=0.09$), compared to the infusions of naked viruses. Although differences are not statically significant, there exists a tendency towards increased viral particles accumulation when using

mCelyvir compared to naked viruses. No differences were found in spleens, livers and kidneys. The spleens and the lungs were the organs in which the highest amount of virus was detected (Figure 2).

Changes on local tumor immunity upon systemic administration of murine Celyvir in a spontaneous model of neuroblastoma

We next studied the local effects of IV administration of mCelyvir in tumor growth, intratumoral immune cell infiltration and expression of tumor microenvironment molecules, using the TH-MYCN transgenic mouse model (spontaneous model) as explained in Materials and Methods. The frequency of tumors was not significantly different among treated and untreated groups (5 out of 19 vs. 6 out of 15, untreated vs. treated, $p>0.1$), similar to what it has been reported for this model [16]. Considering only the animals with macroscopic tumors, we found high variability on tumor volumes (Figure 3A, Supplementary Figure 2). Tumors were recovered and carefully minced. Cells were counted and fresh cell suspensions were labeled with specific flow cytometry antibodies in order to analyze tumor infiltrating immune cell populations. Complete

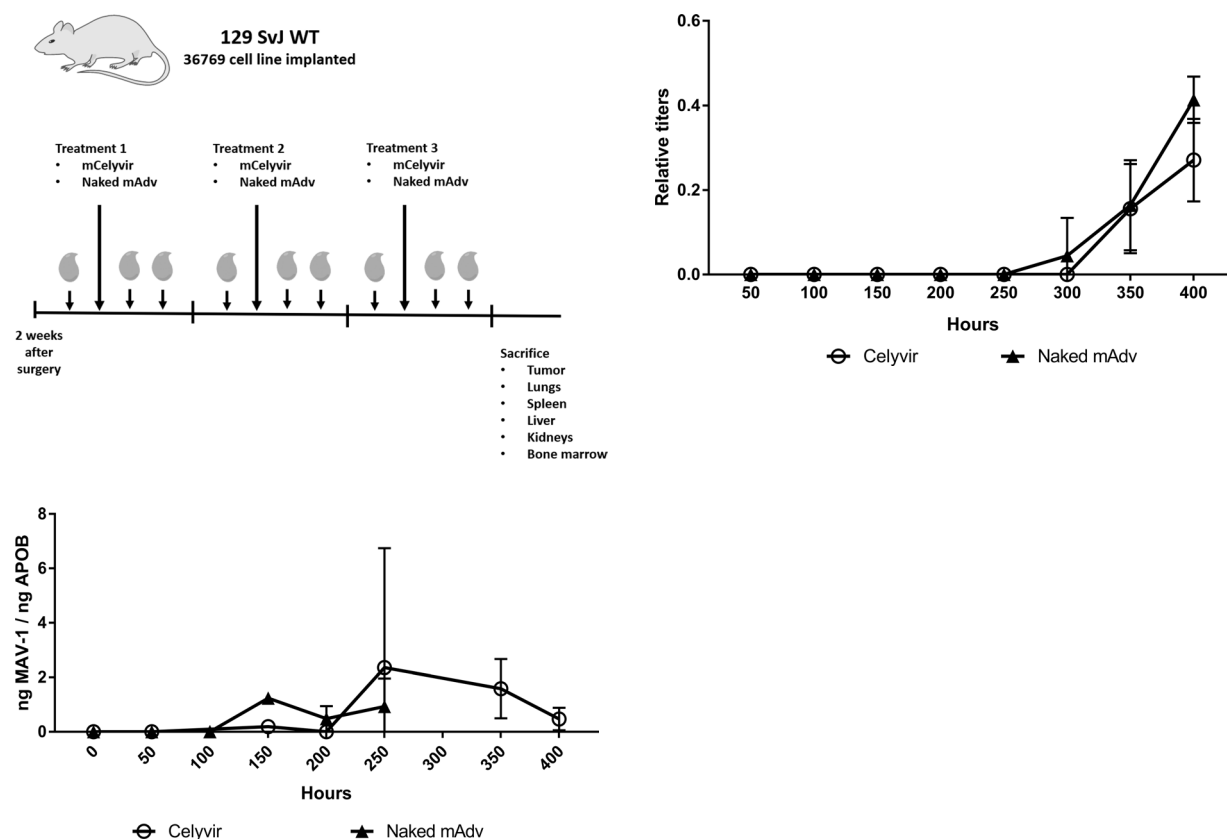


Figure 1: Kinetic of circulating anti-adenovirus antibodies and viral particles following repeated infusions of mCelyvir. (A) Schematic representation of the experimental procedure. (B) MAV-1 relative quantitation of serum anti-adenovirus antibody levels of mice treated with mCelyvir or naked mAd. (C) qRT-PCR amplification of MAV-1 specific sequence from peripheral blood samples of the same mice.

flow cytometry strategy is summarized in Supplementary Figure 3. We normalized the number of immune cells per milliliter of tumor to allow for comparisons. Even though no significant differences were found, tumors from treated mice showed a trend towards higher immune infiltration compared to untreated ones (Figure 3B). This difference was related to a higher infiltration of lymphocytes of the adaptive immune system, T- and B-lymphocytes (CD45+ CD3+ and CD45+ B220+, respectively), while myeloid (CD45+, CD11b+) and dendritic cell (CD45+, CD11c+) infiltration tended to be higher among untreated mice. All subsets of myeloid (MDSC-granulocytic, MDSC-monocytic, M1-TAM, M2-TAM) and DC (plasmacytoid and conventional) showed higher numbers per mL in the control group. On the other hand, systemic therapy with mCelyvir resulted in non-significant increased mean values of CD8 and CD4 T lymphocytes per tumor volume, expressing markers of recent and sustained T cell activation (OX40 among CD8, PD1 and LAG3 among both CD4 and CD8, and TIM3 among CD4). CD4 and CD8 T lymphocytes expressing PD1 were enriched 150 and 33 times respectively, relative to untreated mice (Supplementary Table 2). At the same time, we did not find differences in the percentages of these leukocyte subsets in peripheral blood. (Supplementary Figure 4).

We also quantified the expression levels of several genes related with immune function as mean of assessing the TME status and changes related with therapy. We found that treated mice expressed significant lower levels of genes associated to a protumoral TME (*Arg1*, *Arg2*, *Foxp3*, *Il-10*, *Tgfb*, *Vegf*, *Nos2*) and higher (but non-significantly) levels of genes associated to a sustained lymphocyte activation (*CD80* and *CD86*, both ligands of *CTLA-4*) and a more inflammatory environment (chemokines *CCL2* and *CXCL10*) (Figure 3C).

Changes on local tumor immunity upon systemic administration of murine celyvir in an induced model of neuroblastoma

The fact that a significant number of spontaneous TH-MYCN animals did not develop tumor during the experimental period, and among those that did, the time of tumor initiation may not be homogeneous, contributed to the high variability found in the previous experiments. Therefore, the impact of therapy may not be comparable among groups. As alternative, we used an induced tumor model similar to that used for studying the systemic response and biodistribution experiments. In this model tumor cells are orthotopically implanted in the suprarenal area of wild type mice and therapy is given at the same time from tumor initiation.

Mice were treated and processed as explained before. All the animals showed macroscopic tumors in the area where cells were implanted. We found that tumors from treated mice (n=6) were significantly smaller than those of untreated controls (n=7) (Figure 4A, $p=0.045$, and Supplementary Figure 5). We also analyzed intratumoral immune populations by flow cytometry. We normalized the number of immune cells per milliliter of tumor to allow for comparisons. Tumors from treated mice had significantly higher immune infiltration compared to untreated ones, and this difference affected to all major leukocyte subpopulations (Figure 4B). Systemic therapy with mCelyvir resulted in increased numbers of CD4 T lymphocytes, expressing markers of recent (OX40, 4-1BB) and sustained T cell activation (PD1, LAG3 and TIM3) compared to untreated mice. The same was found for CD8, except for the expression of OX40, which was higher among control mice. CD4 and CD8 TILs expressing 4-1BB were enriched 9 and 55-fold respectively, relative to untreated mice (Supplementary Table 2). Subsets of

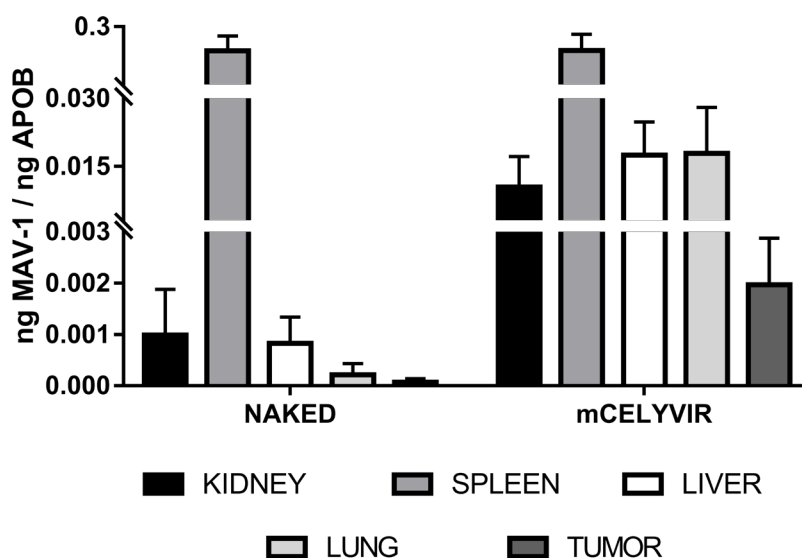


Figure 2: Differential biodistribution of MAV-1 in organs. qRT-PCR amplification of MAV-1 specific sequence from several organs and tumor recovered from mice treated with either naked MAV-1 or mCelyvir.

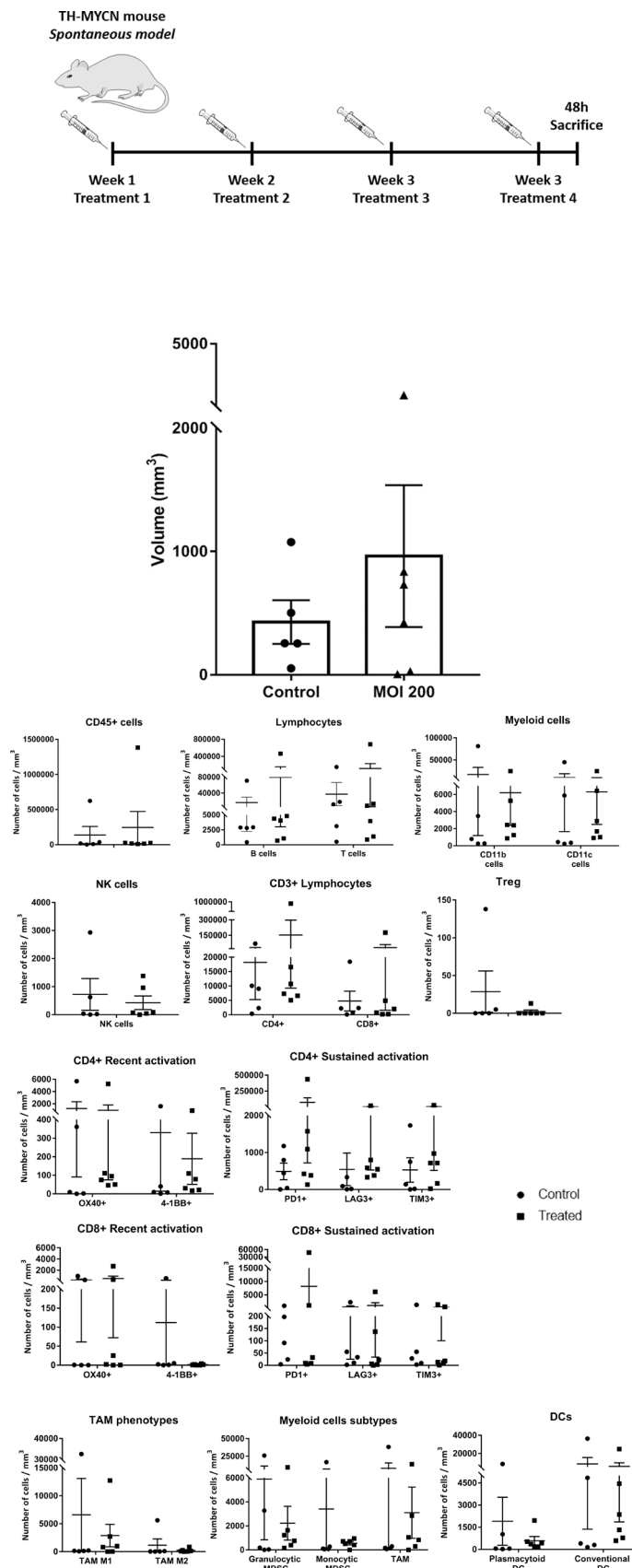


Figure 3: Effects of systemically administered mCelyvir in tumors in a spontaneous model of NB. (A) Tumor volumes recovered after four weekly treatments of intravenous mCelyvir and untreated controls. **(B)** Infiltrating immune cells per milliliter of tumor in both groups of animals. **(C)** Expression levels of immune-related genes of tumor microenvironment analyzed by qRT-PCR. Results were normalized to untreated controls (normalized value = 1). Statistics differences are represented by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

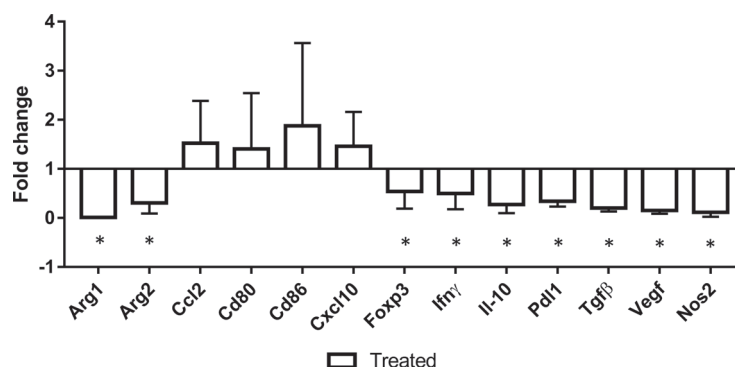


Figure 3: Effects of systemically administered mCelyvir in tumors in a spontaneous model of NB. (A) Tumor volumes recovered after four weekly treatments of intravenous mCelyvir and untreated controls. (B) Infiltrating immune cells per milliliter of tumor in both groups of animals. (C) Expression levels of immune-related genes of tumor microenvironment analyzed by qRT-PCR. Results were normalized to untreated controls (normalized value = 1). Statistics differences are represented by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

MDSCs (granulocytic and monocytic), TAMs (TAM1 and TAM2) and DCs (plasmacytoid and conventional) were also higher in treated mice compared to control ones.

Finally, we performed qRT-PCR analysis to determine changes in expression of TME genes. The main changes found in gene expression levels affected *Arg2* (higher levels among treated mice) (Figure 4C).

DISCUSSION

Oncolytic virotherapy can be considered as a form of cancer immunotherapy [4], since the reported clinical benefits have been associated with antitumor immune phenomena initiated by infection and oncolysis. The role of the immune system during treatment with oncolytic viruses has two different facets, with a direct impact on the results of the therapy. On the one hand, antiviral immunity may be an important potential limitation. It has been described that natural killer (NK) cells interfere with the action of oncolytic viruses, decreasing and even eliminating their efficacy [17]. It is also known that adaptive immunity has developed many mechanisms to destroy viral infections [18]. On the other hand, oncolysis causes the death of tumor cells with the possible release of tumor-associated antigens. These antigens, together with the danger signals [19] associated with viral infection, can stimulate an antitumor immune response [20] that increases the clinical effect in a very significant way.

The fact that MSCs are used for the production of Celyvir has very important implications in the development of immune responses that occur in these patients, which makes them different from those uses of virotherapy without MSCs. The effects that MSCs have on antigen-presenting cells (APCs, including DCs) and immune effector cells are well known [7–14]. It has also been reported that MSCs in the autologous context and in animal models can function as APCs [21, 22]. Therefore, the MSCs of Celyvir could exert an immunomodulatory role, participate in the presentation of antigens, or in both

processes. In principle, MSCs infected with adenoviral vectors have not shown great changes in their phenotypic or functional characteristics [23]. From the point of view of the clinical practice with Celyvir, the MSCs could diminish the antiadenoviral response, due to its immunomodulatory role, facilitating and thus increasing the oncolytic action of the virus. In addition, the use of repeated administrations of an adenovirus (the regimen of treatment with Celyvir consists of weekly doses) could contribute to the depletion of the antiadenoviral immune response, comparable to that described in patients with other viral infections [24].

We present here a model that allows the study of many important aspects related to the Celyvir strategy we are developing in children with cancer. The TH-MYCN mouse recapitulates the main genetic and clinical characteristics of NB with amplified MYCN, and has been used over the last 20 years in many studies of basic biology and preclinical research [25]. One aspect that has not been intensively studied in this model is the profile of infiltrating immune cells of the tumors, both at baseline and after the administration of treatments. This point is very important in the case of immunotherapies. In the TH-MYCN mouse tumors develop in an immunocompetent host, with the appropriate tissue microenvironment, reproducing the conditions that allow the interaction of the immune system with the developing tumor.

We have treated these mice with a therapeutic regime similar to that we use in patients, i.e., an oncolytic adenovirus carried in MSCs, administered repeatedly through systemic infusions. MAV-1 is a murine oncolytic adenovirus comparable to ICOVIR-5 [1]: MAV-1 and ICOVIR-5 have genetic modifications that allow them to replicate preferentially in cells in which retinoblastoma (Rb) pathway is deregulated [15], a common feature of advanced human cancers (including neuroblastoma, NB) but not in healthy cells; MAV-1 and ICOVIR-5 are also able to replicate in MSCs, although at significant lower levels compared to replication in tumor cell lines [1]

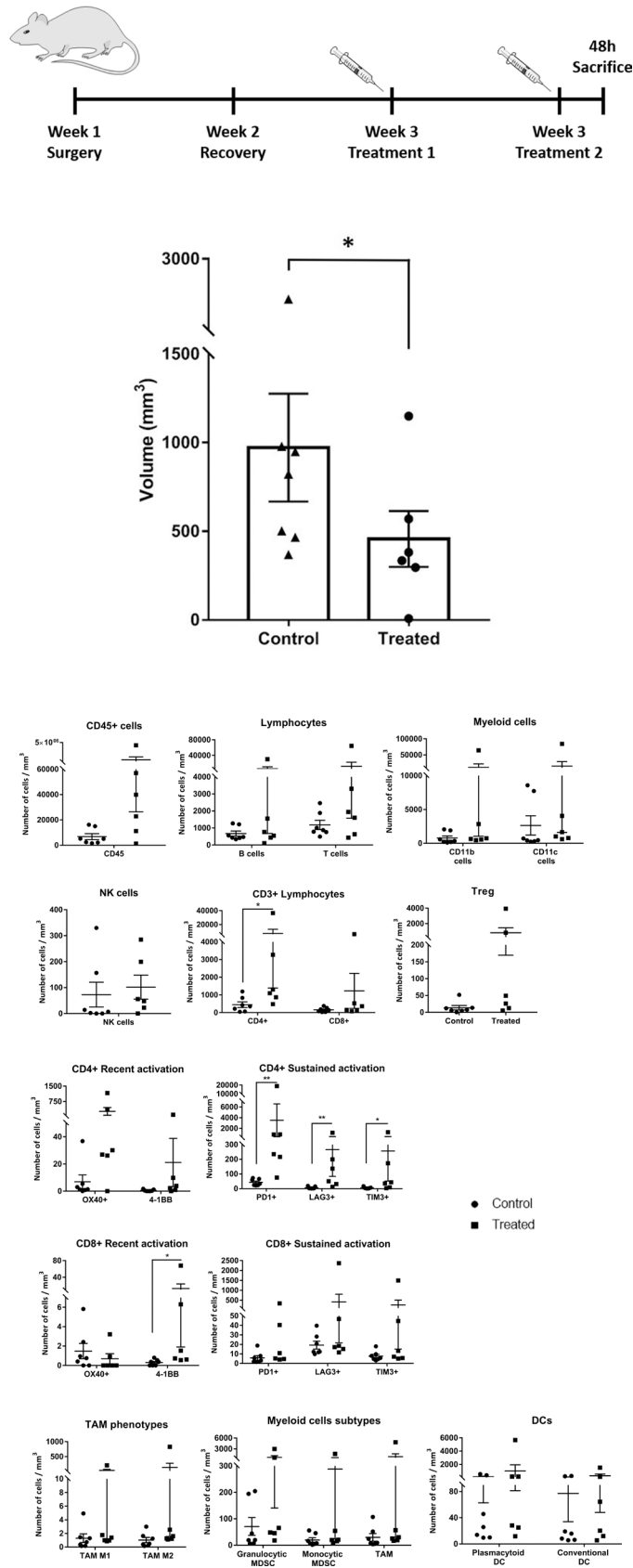


Figure 4: Effects of systemically administered mCelyvir in tumors in an induced model of NB. (A) Tumor volumes from TH-MYCN recovered after two weekly treatments of intravenous mCelyvir and untreated controls. **(B)** Infiltrating immune cells per milliliter of tumor in both groups of animals. **(C)** Expression levels of immune-related genes of tumor microenvironment analyzed by qRT-PCR. Results were normalized to untreated controls (normalized value = 1). Statistics differences are represented by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

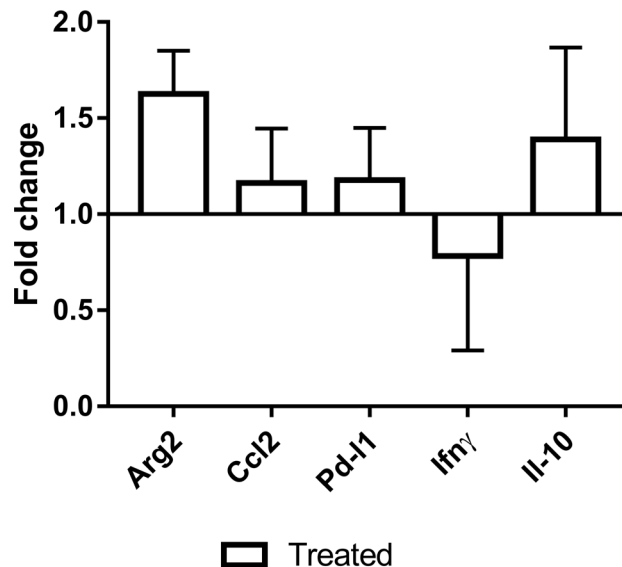


Figure 4: Effects of systemically administered mCelyvir in tumors in an induced model of NB. (A) Tumor volumes from TH-MYCN recovered after two weekly treatments of intravenous mCelyvir and untreated controls. (B) Infiltrating immune cells per milliliter of tumor in both groups of animals. (C) Expression levels of immune-related genes of tumor microenvironment analyzed by qRT-PCR. Results were normalized to untreated controls (normalized value = 1). Statistics differences are represented by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

(Supplementary Figure 1A, 1B, 1C). We confirm an excellent safety profile for this therapy in mice, with no adverse effect or discomfort in the recipients (as happens in human patients [1–3]). Compared to naked virus, the repeated administration of mCelyvir resulted in relative accumulation of the oncolytic virus in organs such as spleen and lung, likely due to the sifting effect of these organs for the infused cells. Interestingly, mCelyvir also resulted in higher amount of virus in the tumor masses compared to the infusion of naked viral particles, underscoring that the carrier cells outcompeted the direct administration in oncolytic virotherapy. These results would indicate that Celyvir could efficiently target tumors metastasizing into the lungs, such as pediatric sarcomas or some adult carcinomas. The protection that MSCs could provide to the oncolytic adenovirus did not preclude the development of an antiadenoviral immune response, as manifested by our results not only in murine models but also in our experience in human patients [2]. However, the presence of circulating antiadenoviral antibodies did not prevent the changes detected at the tumor masses.

Less than half of the TH-MYCN mice developed a tumor during the time we did the experimental work, as it has been previously reported [16]. In addition, the time of tumor initiation is not homogeneous in this spontaneous model. Most mice develop tumors between weeks 6 and 9 of life, predominantly in the paraspinal region of these mice, and can be palpated only when they are large enough, which makes very difficult to know when a tumor is initiating on these mice. Also, no image system was available to follow up the development of these tumors and therefore choose the best moment to start treatment. All these facts pose limitations and

account for a high variability of results when therapies are administered at the same starting time-point. Therefore, in addition to the spontaneous model we used an induced one, in which tumor cells are orthotopically implanted in the suprarenal area of 129/SvJ wild type mice [26–28]. In the latter, conditions such as frequency of tumors and time of tumor initiation are similar among animals in treated and control groups. Using any of the models we found that the systemic administration of mCelyvir resulted in local changes in the tumor masses related to their immune landscape. Since we did not find major changes in circulating leukocytes (Supplementary Figure 4), the scenario at the tumor represents a localized rather than generalized effect. Therapy caused an increased infiltration of immune cells per unit of tumor volume when compared to untreated mice. The recruitment of immune cells has been already reported when oncolytic viruses were administered directly into the tumor masses [29, 30] and our results show that the same happens when carrier cells systemically deliver the virus. We could also prove the presence of oncolytic virus in the tumor masses upon sacrifice.

Therapy also caused changes in the quality of immune cell infiltrates. Increased B and T lymphoid infiltration was independent of the type of model analyzed, while myeloid and DC subsets were affected mainly in the induced model. Others have reported that intratumoral administrations of oncolytic viruses in mice [29, 31] induced inflammatory responses with activation of CD4 and CD8 T lymphocyte infiltration in treated lesions. We also found that infiltrating CD4 and CD8 lymphocytes showed changes in markers of T cell activation and exhaustion upon repeated mCelyvir administration [32],

suggesting continued activity of the tumor infiltrating T lymphocytes (TILs). TILs expressing activation markers were more enriched (relative to untreated mice) in the induced model, both CD4 and CD8, while the spontaneous model showed enrichment of CD4 and CD8 expressing exhaustion markers. Although we did not test the specificity of TILs activity in this work (antitumoral / antiadenoviral / non-specific), the immunophenotypic differences suggest a more active and less exhausted TIL repertoire in the induced model after mCelyvir therapy, which might explain the better antitumoral effect seen in terms of tumor volume.

We also analyzed changes related to the tumor microenvironment, specifically of molecules with a known role in the balance pro and antitumoral that modulates tumor growth. Systemic administration of mCelyvir was followed by changes in the TME, more remarkable in the spontaneous model than the induced one. After treatment, TME showed a less pro-tumoral and more inflammatory profile, a scenario that contributes to create a more pro-immune local situation for an antitumor immune response, as has been previously described [33, 34]. Today it is well accepted the immunomodulatory role associated to oncolytic virotherapy through several secondary mechanisms derived from the tumor cell infection itself [6]. In our experience, TME changed towards a more inflamed environment, evidenced by the increase of cytokines like CXCL10 and CCL2 [35, 36], and the decrease of immunosuppressive molecules (like FoxP3 and Nos2), and molecules that promote tumor growth and invasiveness (like IL10 and TGF β) [37–39]. Therefore, oncolytic virotherapy with Celyvir could have not only a lytic effect in tumor cells, but could also immunomodulate the TME so other therapies can be administered with a higher chance of achieving a clinical response.

We are using the Celyvir strategy to treat kids with metastatic tumors [1–3]. We have found changes in the immune landscape of primary tumors of patients receiving Celyvir, similar to those described in this paper [27]. We found differences in immune cell infiltration and gene expression levels when comparing the spontaneous versus induced model, considering only non-treated mice. There were higher levels of immune infiltration and levels of gene expression (pro- and anti-tumoral genes) in the non-treated mice of the spontaneous model (Supplementary figure 6A, 6B). These differences may likely be due to the extended time and more physiological process for tumor and TME development in the spontaneous model, and the higher numbers of tumor initiating cells in the induced one. The impact of mCelyvir therapy in each scenario was different, changes in infiltration and TME more pronounced in the spontaneous model and tumor volume in the induced one. These differences in the response to mCelyvir may be related to the different doses used in each model. Nevertheless, even though these two models are not completely identical, and taking into

account differences in the murine and human oncolytic adenoviruses, we believe that the models described here will help us in optimizing this type of therapy by enabling the study of crucial events related to the immune responses affecting both the medicine and the tumor.

MATERIALS AND METHODS

Mice

TH-MYCN- 129X1/SvJ transgenic mice [40] were used for spontaneous tumor treatment experiments. Wild type mice were also used for mouse NB tumor cell line transplant experiments. All mice were bred, maintained and used following guidelines issued by the European and Spanish legislations for laboratory animal care. All experiments involving animals were approved by the OEBA (Organ for Evaluating Animal Wellbeing) at CIEMAT and Madrid Regional Department of Environment, with reference PROEX 186/15. Transgenic mice were identified as previously described [41] using N008 (5'-TGGAAGCTTCTTATTGGTAGAAACAA-3') and N009 (5'-AGGGATCCTTTCCGCCCCGTTTCGTTTTAA-3') for human MYCN gene detection.

Cell culture and virus production

WT 129/SvJ mice derived mesenchymal stem cells (mMSC) were obtained from adipose tissue enzymatically digested with 1 mg/mL of collagenase B (Roche; Catalog #11088815001) during 2 hours at 37°C in constant shaking. Mononuclear cells were washed twice with PBS and pelleted by centrifugation at 1500 rpm for 5 minutes. Cells were seeded at 100.00 cells / cm² with murine MesenCult Expansion Kit (STEMCELL Technologies; Catalog #05513) until passage 3. From then on mMSC were maintained with DMEM with Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FBS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) and 1% penicillin / streptomycin (10.000 U/mL, Gibco; Catalog #15140122). Murine MSC were characterized by flow cytometry with specific antibodies.

Non-adherent spheres derived from a TH-MYCN tumor mass (36769 cell line) were generated in Dr. Louis Chesler's laboratory. They were maintained using DMEM/F12 (Gibco; Catalog #10565018) supplemented with 1X B-27 without vitamin A (Gibco; Catalog #12587010), 20 ng/mL of murine EGF and 40 ng/mL of murine FGF (R&D Systems, Minneapolis, MN). Spheres were passed when confluent, and seeded again at 1/6 of its initial concentration.

The 37.1 cell line was used for MAV-1 dIE102 virus production. The oncolytic murine adenovirus MAV-1 dIE102 (mAd) was previously developed by Dr. Katherine Spindler's group [15]. Similar to ICOVIR-5 [1], MAV-1 has genetic modifications that allows it to replicate preferably in cells in which retinoblastoma (Rb)

pathway is deregulated [15]. First virus aliquot was kindly provided by Dr. Spindler. Successive virus stocks for our experiments were produced in our lab using 37.1 cells as previously described by Spindler group. The cells were maintained with DMEM (4.5 g/L glucose, Gibco; Catalog #11965092) supplemented containing 5% FBS (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences) and G418 (200 µg/mL, Sigma; Catalog #G8168-10ML). For virus propagation, cells were passaged one time in absence of G418, and 10^{-5} M dexamethasone was added 5-24 hours prior infection to induce E1A expression [15]. Viral physical titer from supernatants was determined by spectrophotometry using NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and aliquoted and stored at -80°C until use.

Preparation of murine celyvir.

For murine Celyvir (mCelyvir) preparation, mMSC were used between passages 5 and 7 for every experiment. Cells were trypsinized (TriPLE Express, Life Technologies; Catalog #12604013) and counted with trypan blue. Viable mMSC were infected at MOI 200 with MAV-1 dIE102 during 90 minutes at 37° C in constant shaking. After that, cells were washed to remove virus excess and resuspended for intravenously (IV) administration in mice (100.000 infected cells in 150 µL of non-supplemented DMEM).

Tumor mice model and mCelyvir treatment

We either used the TH-MYCN transgenic mouse model (spontaneous) or implanted 3×10^5 TH-MYCN cells on the suprarenal region of 129/SvJ mice (genetic background of the TH-MYCN transgenic mouse, induced model).

All treatments were administered intravenously, either mCelyvir or naked adenovirus.

In the spontaneous model, 8 weeks old TH-MYCN mice were treated intravenously with mCelyvir during 4 weeks while control group remained untreated. Both groups of mice were sacrificed two days after the 4th treatment and peripheral blood and tumor mass were obtained.

For the induced tumor model, 3×10^5 cells from a single cell suspension of the 36769 cell line were inoculated into the left adrenal gland of 129/SvJ-WT mice by surgery. Mice were left to recover for 2 weeks and then received 2 weekly doses of mCelyvir or remained untreated. Mice were sacrificed two days after the second treatment and peripheral blood and tumor mass were analyzed.

Tumor volume was calculated with the formula $(3.14/3) \times (a/2)^2 \times (b/2)$. A tumor piece was conserved at -80°C for qRT-PCR analysis. The rest of the tumoral mass and the peripheral blood were processed freshly for flow cytometry analysis.

Biodistribution and viral replication studies

Mice with implanted tumors were treated intravenously during 3 weeks with mCelyvir or naked adenovirus once per week. The amount of naked mAd used was equivalent to that used in Celyvir preparation. After the last treatment, mice were sacrificed and bone marrow, spleen, lung, liver, kidney, tumor mass and peripheral blood (PB) were extracted to further analyze the presence of viral DNA in the different tissues.

For detection of mAdv presence on tumors, conventional PCR reaction was performed with 30 ng of genomic DNA using GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison USA; Catalog #M7822) and specific MAV-1 forward (5'-GGCCAACACTACCGACACTT-3') and MAV-1 reverse (5'-TTTTGTCTCTGTGGCATTGA-3') primers. Conventional PCR reaction consisted in an initial denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C during 1 minute, as previously described [42].

To study the kinetics of viral particles in peripheral blood, treated mice were bleed just before each treatment and also one-two days after. qRT-PCR was performed using hexon (MAV-1) and ApoB (as genomic control) primers. The same qRT-PCR procedure was used to quantify adenovirus in distinct organs (bone marrow, spleen, lung, liver, kidney). The reactions were run in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, California USA) and results were analyzed using 7500 Real-Time PCR software (Applied Biosystems™, California USA). Standard curves of genomic DNA and MAV-1 DNA were used for quantitation purposes.

Flow cytometry analysis

To confirm the phenotype of mMSC cells were stained with specific antibodies during 30 min at 4 degrees. MSC were positive for CD29, CD44, and Sca-1 and negative for CD45, CD11b, and CD14 (data not shown).

To analyze immune infiltrated cells, tumor mass was carefully washed with HBSS 1X and mechanically processed prior enzymatic digestion with 1 mg/mL of collagenase D (Roche; Catalog #11088858001). Tumor cell suspension was counted by trypan blue and 5×10^5 alive cells were labelled with specific antibodies during 30 min at 4 degrees. Red blood cells were lysed using QuickLysis (Cytognos; Catalog #CYT-QL-1) for 20 min in darkness. Used antibodies are indicated in supplementary information (Supplementary Table 1). Samples were acquired in a FACS Canto II (BD, San Jose, CA) cytometer and analyzed using FACS Diva software.

RNA extraction and qRT-PCR analysis

To analyze gene expression of different stroma genes, chemokines and immune-related molecules, 30 µg

of each tumor piece conserved at -80°C were mechanically disrupted and RNA extraction was performed with RNeasy Mini kit (Qiagen; Catalog #74106). RNA concentration was determined by NanoDrop 1000. For cDNA synthesis, 1 µg of RNA was retrotranscribed using SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Catalog #11754050). For qRT-PCR analysis, specific murine TaqMan assays (Applied Biosystems™, California USA) were used: *Gapdh* (Mm99999915_g1), *Arg1* (Mm00475988_m1), *Arg2* (Mm00477592_m1), *Ccl2* (Mm00441242_m1), *Cd80* (Mm00711660_m1), *Cd86* (Mm00444543_m1), *Cxcl10* (Mm00445235_m1), *FoxP3* (Mm00475162_m1), *Ifny* (Mm01168134_m1), *Il-10* (Mm00439614_m1), *Pdl1* (Mm00452054_m1), *Tgfb* (Mm01178820_m1), *Vegf* (Mm01281449_m1) and *Nos2* (Mm00440502_m1).

qRT-PCR reaction was performed in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, California USA) and results were analyzed using 7500 Real-Time PCR software (Applied Biosystems™, California USA). A relative quantification was used (DDCt method) using non-treated groups of mice as reference.

Serological studies

Fresh blood collected from spontaneous model TH-MYCN mice at the moment of sacrifice was tested for detection of specific MAV-1 antibodies in serum using Mouse Adenovirus (FL/K87) ELISA Kit (Dynamimed, Madrid Spain). Experiment was performed following manufacturer's instructions. Briefly, peripheral blood samples were collected from animals and serum was obtained by centrifugation and diluted 50 times in order to proceed with ELISA. Samples were incubated in the plate as well as proper positive and negative controls at 37°C during 45 minutes. Wells were carefully washed five times before adding peroxidase conjugate and incubate again at 37°C during 45 minutes. After last five washes, peroxidase substrate was added and plate was incubated for 30 minutes prior to read the absorbance at 495 nm.

Statistics

All statistical analyses were performed using Stata/IC 11.0 (StataCorp LP, College Station, TX, <http://www.stata.com/>). The nonparametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare quantitative variables. Results were considered statistically significant with $p < 0.05$. All graphics present the mean \pm SEM.

Graphics

All graphics presented in this work have been created using GraphPad Prism 7 (<https://www.graphpad.com/>).

Abbreviations

mCelyvir: murine Celyvir; IV: intravenous / intravenously; TME: tumor microenvironment; NB:

neuroblastoma; MSC: mesenchymal stem cells; qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

Author contributions

LF collected and analyzed the data. MR and AG designed experiments and analyzed the data. CA and LG helped in collecting data. AL performed surgeries in mice. MR, AG and LF wrote the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jesús Martínez and Edilia Almeida from CIEMAT for taking care of animals.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

FUNDING

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III under grants PI13/02487 and PI16/02008. MR is supported by Asociación Pablo Ugarte, Asociación NEN and Fundación Neuroblastoma.

REFERENCES

1. García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, Martínez-Quintanilla J, Arriero M del M, Lassaletta A, Madero L, Ramírez M. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17: 476–83. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.4>. [PubMed]
2. Ramirez M, Ruano D, Moreno L, Lassaletta Á, Sirvent FJB, Andiñ M, Hernández C, González-Murillo Á, Melen G, Alemany R, García-Castro J, Madero L. First-in-child trial of celyvir (autologous mesenchymal stem cells carrying the oncolytic virus ICOVIR-5) in patients with relapsed and refractory pediatric solid tumors. *J Clin Oncol.* 2018; 36: 10543–10543. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.10543
3. Melen GJ, Franco-Luzón L, Ruano D, González-Murillo Á, Alfranca A, Casco F, Lassaletta Á, Alonso M, Madero L, Alemany R, García-Castro J, Ramírez M. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 2016; 371: 161–161. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.036>. [PubMed]
4. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14: 559–559. <https://doi.org/10.1038/nrc3770>. [PubMed]

5. Tang H, Wang Y, Chlewicki LK, Zhang Y, Guo J, Liang W, Wang J, Wang X, Fu Y-X. Facilitating T Cell Infiltration in Tumor Microenvironment Overcomes Resistance to PD-L1 Blockade. *Cancer Cell*. 2016; 29: 285–285. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.004>. [PubMed]
6. Achard C, Surendran A, Wedge M-E, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine*. 2018; 31: 17–17. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.04.020>. [PubMed]
7. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005; 105:2214–2214. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2921>. [PubMed]
8. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011; 2: 34. <https://doi.org/10.1186/scrt75>. [PubMed]
9. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005; 105: 4120–4120. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>. [PubMed]
10. Li Y-P, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, Hequet O, Bertrand Y, Ou-Yang J-P, Stoltz J-F, Miossec P, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2008; 180: 1598–1598. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>. [PubMed]
11. Shi M, Liu Z-W, Wang F-S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011; 164: 1–1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x>. [PubMed]
12. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008; 111: 1327–1327. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>. [PubMed]
13. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, San Miguel JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008; 93: 1301–1301. <https://doi.org/10.3324/haematol.12857>. [PubMed]
14. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, Zhu X, Lu C, Liang W, Liao L, Zenke M, Zhao RCH. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009; 113: 46–46. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-154138>. [PubMed]
15. Smith K, Ying B, Ball AO, Beard CW, Spindler KR. Interaction of mouse adenovirus type 1 early region 1A protein with cellular proteins pRb and p107. *Virology*. 1996; 224: 184–184. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0520>. [PubMed]
16. Rasmuson A, Segerström L, Nethander M, Finnman J, Elfman LHM, Javanmardi N, Nilsson S, Johnsen JI, Martinsson T, Kogner P. Tumor development, growth characteristics and spectrum of genetic aberrations in the TH-MYCN mouse model of neuroblastoma. *PloS One*. 2012; 7: e51297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051297>. [PubMed]
17. Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Price R, Wojton J, Pradarelli J, Mao H, Wei M, Wang Y, He S, Harcastle J, Fernandez SA, Kaur B, Lawler SE, et al. NK cells impede glioblastoma virotherapy through Nkp30 and Nkp46 natural cytotoxicity receptors. *Nat Med*. 2012; 18: 1827–1827. <https://doi.org/10.1038/nm.3013>. [PubMed]
18. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004; 78: 5535–5535. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004>. [PubMed]
19. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296: 301–301. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>. [PubMed]
20. Qiao J, Kottke T, Willmon C, Galivo F, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, Ryno P, Barber GN, Chester J, Selby P, Harrington K, Melcher A, et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat Med*. 2008; 14: 37–37. <https://doi.org/10.1038/nm1681>. [PubMed]
21. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006; 107: 4817–4817. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0057>. [PubMed]
22. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006; 107: 2570–2570. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2793>. [PubMed]
23. Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, O'Flynn L, Cregg M, Wilk M, Odoardi F, Lohan P, O'Brien T, Nosov M, Ritter T. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: *in vitro* responses and *in vivo* immune responses after cell transplantation. *PloS One*. 2012; 7: e42662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042662>. [PubMed]
24. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12: 492–492. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>. [PubMed]
25. Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 245–245. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.09.011>. [PubMed]

26. Cardoso CC, Bornstein SR, Hornsby PJ. Optimizing orthotopic cell transplantation in the mouse adrenal gland. *Cell Transplant*. 2010; 19: 565–565. <https://doi.org/10.3727/096368910X509077>. [PubMed]
27. Kroesen M, Brok IC, Reijnen D, van Hout-Kuijer MA, Zeelenberg IS, Den Brok MH, Hoogerbrugge PM, Adema GJ. Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents. *Cancer Immunol Immunother* CII. 2015; 64: 563–563. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1663-y>. [PubMed]
28. Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC, Madero L, Ramírez M. [Establishment of a preclinical neuroblastoma model in immunocompetent mice]. *Cirugia Pediatr Organo Of Soc Espanola Cirugia Pediatr*. 2016; 29: 66–66.
29. Tähtinen S, Grönberg-Vähä-Koskela S, Lumen D, Merisalo-Soikkeli M, Siurala M, Airaksinen AJ, Vähä-Koskela M, Hemminki A. Adenovirus Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy by Recruiting Immune Cells to and Promoting Their Activity at the Tumor. *Cancer Immunol Res*. 2015; 3: 915–915. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0220-T>. [PubMed]
30. Tuve S, Liu Y, Tragoolpua K, Jacobs JD, Yumul RC, Li Z-Y, Strauss R, Hellström K-E, Disis ML, Roffler S, Lieber A. *In situ* adenovirus vaccination engages T effector cells against cancer. *Vaccine*. 2009; 27: 4225–4225. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.074>. [PubMed]
31. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, Park JS, Mansour M, Palese P, Merghoub T, Wolchok JD, Allison JP. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 226ra32. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008095>. [PubMed]
32. Lee S-W, Park Y, Song A, Cheroutre H, Kwon BS, Croft M. Functional dichotomy between OX40 and 4-1BB in modulating effector CD8 T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006; 177: 4464–4464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4464>. [PubMed]
33. Locy H, de Mey S, de Mey W, De Ridder M, Thielemans K, Maenhout SK. Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend. *Front Immunol*. 2018; 9:2909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02909>. [PubMed]
34. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, Olszanski AJ, Malvey J, Cebon J, Fernandez E, Kirkwood JM, Gajewski TF, Chen L, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*. 2018; 174: 1031–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.035>. [PubMed]
35. Layer JP, Kronmüller MT, Quast T, van den Boorn-Konijnenberg D, Efferm M, Hinze D, Althoff K, Schramm A, Westermann F, Peifer M, Hartmann G, Tüting T, Kolanus W, et al. Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *Oncoimmunology*. 2017; 6: e1320626. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1320626>. [PubMed]
36. Relation T, Yi T, Guess AJ, La Perle K, Otsuru S, Hasgur S, Dominici M, Breuer C, Horwitz EM. Intratumoral Delivery of Interferon-γ-Secreting Mesenchymal Stromal Cells Repolarizes Tumor-Associated Macrophages and Suppresses Neuroblastoma Proliferation *In Vivo*. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2018; 36: 915–915. <https://doi.org/10.1002/stem.2801>. [PubMed]
37. Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA, Lode HN. IFN-γ-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001; 166: 6944–6944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6944>. [PubMed]
38. Shao J-B, Gao Z-M, Huang W-Y, Lu Z-B. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-β1 in neuroblastoma cells. *Int J Oncol*. 2017; 50: 1623–1623. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3954>. [PubMed]
39. Zhen Z, Guo X, Liao R, Yang K, Ye L, You Z. Involvement of IL-10 and TGF-β in HLA-E-mediated neuroblastoma migration and invasion. *Oncotarget*. 2016; 7: 44340–44340. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10041>
40. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1997; 16: 2985–2985. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.2985>. [PubMed]
41. Haraguchi S, Nakagawara A. A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PloS One*. 2009; 4: e6902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006902>. [PubMed]
42. Lenaerts L, Verbeken E, De Clercq E, Naesens L. Mouse adenovirus type 1 infection in SCID mice: an experimental model for antiviral therapy of systemic adenovirus infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4689–4689. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4689-4699.2005>. [PubMed]

Anexo 9 – Primer análisis proporcionado por Anaxomics (*Deliverable 1*).



Identification of MSCs' key genes and biomarkers associated with the patient response to Celyvir, by means of systems biology

-Deliverable-

Client Name:	Dr. Manuel Ramirez Orellana_Fundación Oncohematología Infantil
Date of version:	31 st July 2018
Date of submission:	1 st August 2018
Project Code:	P-21_2018
Prepared by:	Cristina Segú - Anaxomics
e-mail:	cely360@anaxomics.com

CONTENT

1	Executive summary	3
2	Introduction and Objectives.....	5
3	Materials and Methods.....	6
4	Results	7
4.1	Statistical analysis.....	7
4.1.1	Secretome differential presence analysis	7
4.1.2	MSCs differential expression analysis	8
4.1.3	Transcriptome – secretome comparison	9
4.2	Enrichment analysis	10
4.2.1	Enrichment results_GSEA analysis	10
4.2.2	Biological relationship between gene expression enrichment results and secretome data	17
4.3	Results graphical representation	20
5	Key findings	22
6	Recommended next steps.....	23
7	Bibliography	24

1 EXECUTIVE SUMMARY

The client is interested in the identification of differential genes and proteins between the Celyvir responder and non-responder patients (two sources of data: mesenchymal stem cells (MSCs) transcriptome and secretome) and the subsequent evaluation of biological processes associated with them.

RESULTS AND KEY FINDINGS

- **SECRETOME DATA:** A total of **127 proteins** have been selected as candidates to explain differences between responder and non-responder patients. Of these proteins:

- o **3 proteins up-regulated only in responder patients** when compared to controls.
- o **15 proteins up-regulated only in non-responder patients** when compared to controls.

Detailed results are included in “*Secretome_differential_presence*” sheet of “*DataTreatment_Results.xlsx*”.

- **TRANSCRIPTOME DATA:** **15 gene products** have been identified as differentially expressed applying multi-test correction (FDR < 0.05); **113 gene products** have been identified as differentially expressed considering non-corrected p-values (p-value < 0.01) for at least one of the tests performed.

Detailed results are included in “*MSCs_differential_expression*” sheet of “*DataTreatment_Results.xlsx*”.

- **TRANSCRIPTOME – SECRETOME COMPARISON:** Only MMP10 appears as differentially expressed/present (and with contradictory signal) in both datasets. But, interestingly, **68 interactions have been detected** between 51 out of 127 differentially secreted proteins and 22 out of 113 differentially expressed proteins (non-corrected p-value < 0.01).

Detailed results are included in “*Protein_Interactions*” sheet of “*DataTreatment_Results.xlsx*”.

- **ENRICHMENT ANALYSIS:** A total of 140 enriched sets (non-corrected p-value < 0.01) have been found in the transcriptome data: 81 in responder patients and 50 in non-responder patients (“*Enrichment_Results.xlsx*”). Most of the processes can be classified as:

Category	Cohort
Viral infection and nucleic acid metabolism processes	Mainly in responders
Immune system-related processes	Response to virus-related mainly in responders Innate immune system migration and homing mainly in non-responders
MSCs migration regulatory signalling pathways	In both responders and non-responders
Cell-to-cell adhesion	In both responders and non-responders
Mitosis	Mainly in responders
Metabolism	Lipid metabolism in non-responders
Stress response	In both responders and non-responders
Bone marrow fibrosis	In non-responders

The results suggest that:

- **Responder patients** can have a **more efficient viral replication**.
- **Responder patients** possess a **higher capacity to mount a cytotoxic response against infected cells**.
- **Non-responder patients** present increases in **lipid metabolism process**, which can regulate **MSCs differentiation and fate**.
- **Non-responder patients** could have **compromised MSCs function** (appearance of processes related to bone marrow fibrosis and angiogenesis).
- **Both responder and non-responder patients regulate MSCs migration capacity** through different signalling pathways.

Several of the differentially present proteins in the secretome that are present in the enriched sets in the transcriptome data are in contradiction with the enrichment results; there may be **feedback regulatory mechanisms and interconnected regulatory networks that help to finely tune MSCs biology and viral infection response**.

RECOMMENDED NEXT STEPS

According to the obtained results, we recommend the following next steps:

- Evaluation of the lists of differential candidates both in secretome and transcriptome data, in order to identify interesting candidates to explain differences in MSCs biology between Celyvir responder and non-responder patients.
 - The performance of the Objective 2 of proposal 2018_P0122 can help contextualize these candidates in selected biological processes.
 - We recommend the experimental validation with an alternative technique (e.g. PCR) of the most promising candidates (e.g. MMP10, or the proteins highlighted in Table 1, Table 2 or Table 3).
- Experimental validation of the processes highlighted in the present report, specially those not previously reported as differential between Celyvir responder and non-responder patients.
- Evaluation of the results of the enrichment analysis through the use of the “*Enrichment_results*” excel file and cytoscape session (“*CELY360_Enrichmentnetwork.cys*”) provided, in order to consider the relevance of other identified processes not highlighted in the present report.
- Generation of graphical representations using the “*CELY360_Enrichmentnetwork.cys*” to support the obtained results and raised hypotheses.
 - According to the project proposal (2018_P0122), one representation with 1 round of revision will be generated upon client’s request.

2 INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Neuroblastoma is a developmental tumor of young children arising from the embryonic sympathoadrenal lineage of the neural crest. Currently neuroblastoma is the primary cause of death from pediatric cancer for children between the age of 1 and 5 years and accounts for approximately 13% of all pediatric cancer mortality [1].

Celyvir, an innovative therapy based on autologous marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) carrying an oncolytic adenovirus, has been tested for treating children with advanced metastatic neuroblastoma by Dr. Manuel Ramirez and his team. Interestingly, they found differences between patients who responded versus those who did not when analysing their respective MSCs, at the expression levels of adhesion molecules (CCR1, CXCR1 and CXCR4) and in migration capacities in transwell assays, and in immune-related molecules (IFN γ , HLA-DR). These results suggest interpatient differences in the homing and immune modulation capacities of the therapy administered [2].

The objective of the present project is to achieve better understanding of the molecular events explaining the clinical response to Celyvir, through the systems biology-based analysis of the expression level of 1000 proteins from the supernatant (secretome) and the gene expression (mRNAseq) of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders (n=4) and non-responders (n=3).

3 MATERIALS AND METHODS

In a nutshell, the first step of the project was the data management, compilation and treatment of the transcriptomic and secretome data provided by the client. This treatment consisted on a basic statistical analysis (to obtain the differentially present proteins in the secretome data between responder and non-responders, and the ranking parameter from the transcriptomic data for the GSEA) and the mapping from compounds/genes to protein entries according to UniProt KB [3]. The detailed protocol followed can be found on the document *20180713_CELY360_DataTreatmentProtocol.pdf*, sent on the 13th of July. Finally, the transcriptomic data has been subjected to classical statistical analysis [4-6] to identify the most genes with a most differential expression profile between MSCs from responder and non-responder patients.

The transcriptomic data has been submitted to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [7] to identify the differential pathways and molecular processes between the MSCs of Celyvir responders and non-responders patients. This approach ranks the genes according to a specific metric ranking at the top ends of the list the most statistical significant genes. In the present project, the parameter used to rank the genes was the signal to noise ratio. Entries with background signal in all the samples were excluded from the GSEA analysis.

Specifically, the enrichment was run over the following databases: GO terms (Biological Process, Cellular Component, Molecular Function) according to EMBL-EBI / UniProt-GO [8], KEGG pathways [9-12], pathological conditions and motives included in the BED (Anaxomics property databases) [13], PharmGKB pathways [14], the pathways from Small Molecule Pathway Database (SMPDB) [15] and the regulatory molecular mechanisms included in TRRUST database [16].

The sets that presented statistically significant enrichment ($p\text{-value} < 0.01$) have been discussed in the present report. A less restrictive criterion ($0.05 \leq p\text{-value} \leq 0.01$) was set to provide a more extended list of potential results (see "*Enrichement_results*" excel file).

Finally, the overlap on the transcriptomic and secretome data has been evaluated through 2 approaches: (1) direct overlap or interaction between differential proteins in each dataset (KEGG [9-12], REACTOME [17, 18], INTACT [19, 20], BIOGRID [21, 22], HDPR [23] and MINT [24]) and (2) appearance of secretome proteins in the enrichment results.

4 RESULTS

4.1 STATISTICAL ANALYSIS

4.1.1 SECRETOME DIFFERENTIAL PRESENCE ANALYSIS

The complete list of up and downregulated protein candidates is given in the “*Secretome_differential_presence*” sheet of the “*DataTreatment_Results*” excel file, including information on their fold-change value and each cohort’s mean expression.

A total of **121 proteins** have been selected for their differential presence among the responder and non-responder patient samples in the secretome data analysis. A significant **downregulation in the expression levels of 69 proteins** has been detected in the secretome data of MSCs from responders, when compared to non-responders. A total of **52 proteins appear to be upregulated** in the secretome expression of the positive Celyvir response cohort.

An additional amount of **6 proteins** has been highlighted among the secretome expression data. These proteins have consistently been detected only in the Celyvir responder patients cohort, being undetectable in all non-response samples.

Table 1 contains the candidates that present an opposed behaviour in responder and non-responder patients upon treatment (i.e. are increased or decreased in an opposed fashion), which could be the most interesting proteins to study to understand lack of response.

TABLE 1. SECRETOME PROTEINS SIGNIFICANTLY DIFFERENTIAL BETWEEN RESPONDER AND NON-RESPONDER SAMPLES THAT HAVE AN OPPOSED BEHAVIOUR IN FRONT OF MSCs TREATMENT (UPREGULATION → > 1; DOWNREGULATION → < 1).

SIGNIFICANT DIFFERENCES ARE INDICATED BY COLOURS: GREEN BACKGROUND INDICATES SIGNIFICANT UPREGULATION AND RED BACKGROUND INDICATES SIGNIFICANT DOWNREGULATION

UniProt ID	Entity name (Client's data)	FC RESPONSE vs Control	FC NON-RESPONSE vs Control
Q6EMK4	Vasorin	2,287	0,004
Q14766	Latent TGF-beta bp1	1,894	0,607
P01127	PDGF-AB	0,640	1,539
P04085	PDGF-AB	0,640	1,539
P51671	Eotaxin / CCL11	0,636	1,594
Q15109	RAGE	0,586	3,374
P22003	BMP-5	0,270	8,693
P42702	LIF R alpha	0,078	1,837
P05112	IL-4	0,017	6,795
P16591	FER	4,668	0,899
P22792	CPN2	0,592	1,247
O15123	Angiopoietin-2	0,426	1,121
O15389	Siglec-5/CD170	0,424	1,339
P48023	Fas Ligand	0,371	1,401
P27539	GDF1	0,124	1,084
P06727	ApoA4	0,999	1,567

UniProt ID	Entity name (Client's data)	FC RESPONSE vs Control	FC NON-RESPONSE vs Control
P37173	TGF-beta RII	0,997	3,294
P09238	MMP-10	0,898	1,639
P11226	MBL-2	0,876	1,512
P09237	MMP-7	0,783	5,464
Q14005	IL-16	0,737	1,976
P61812	TGF-beta 2	0,727	2,129
P09603	M-CSF	0,685	1,604
Q969J5	IL-22 BP	0,883	1,371
P35443	Thrombospondin-4	0,783	1,383
O43557	LIGHT / TNFSF14	0,728	1,171
Q13007	IL-24	0,710	1,324
P01189	MSHa	0,692	1,465
P39900	MMP-12	0,678	1,049
P42166	Thymopoietin	0,664	1,100

Interestingly, two of the proteins have been described as effectors of neuroblastoma: PDGF-A and PDGF-B are implicated in angiogenesis [25].

The differential expression and presence of these proteins in the secretome of MSCs could be key to understanding the physiological pathways influencing the response to Celyvir treatment. However, the amount of differences is not enough to perform an enrichment analysis; thus, this information will be contrasted with the transcriptome analysis results in the sections below through a network analysis.

4.1.2 MSCs DIFFERENTIAL EXPRESSION ANALYSIS

T-student, Wilcoxon rank-sum and ANOVA tests were run to evaluate statistically significant differences in transcriptome expression between the responder and non-responder patient samples. **Very few positive results have been obtained after multi-test correction** (FDR < 0.05), 15 gene products, and only for ANOVA test (Table 2).

TABLE 2. LIST OF GENES/PROTEINS WITH A SIGNIFICANT DIFFERENTIAL EXPRESSION BETWEEN RESPONDER AND NON-RESPONDER COHORTS, BY MEANS OF ANOVA TEST WITH A MULTI-TEST CORRECTION (FDR<0.05). THE Q-VALUE FOR THE ANOVA FDR TEST AND THE LOG2 OF THE FOLD CHANGE ARE GIVEN. THE COLUMN "SECRETOME" INDICATES WHETHER THE CONCRETE GENE APPEARS (GREEN TICK) OR NOT (RED CROSS) AS A DIFFERENTIALLY EXPRESSED CANDIDATE IN THE SECRETOME ANALYSIS.

Uniprot ID	Gene Name	ANOVA FDR q-value	Log ₂ FC	Secretome
P35573	AGL	0,0128	6,49492	✗
Q12834	CDC20	0,0128	-8,88274	✗
P11597	CETP	0,0128	-9,02274	✗
P09238	MMP10	0,0128	8,65044	✓
P19404	NDUFV2	0,0128	-10,89015	✗
P16284	PECAM1	0,0128	-7,35809	✗

Uniprot ID	Gene Name	ANOVA FDR q-value	Log ₂ FC	Secretome
A2AJT9	CXorf23	0,0128	-6,79375	✗
P17021	ZNF17	0,0221	-9,33322	✗
Q8TE49	OTUD7A	0,0224	8,37531	✗
Q92990	GLMN	0,0224	6,68242	✗
Q8IWZ8	SUGP1	0,0224	-8,93858	✗
Q96Q89	KIF20B	0,0224	-8,57028	✗
Q9NZH4	PTTG3P	0,0224	-10,71427	✗
O60930	RNASEH1	0,0415	8,51271	✗
O75153	CLUH	0,0497	-1,65012	✗

Being less statistically restrictive, a total amount of 113 genes/proteins present a significant non-corrected p-values (p-value <0.01) for at least one of the tests performed. These proteins are delivered in the “*MSCs_differential_expression*” sheet of the excel file “*DataTreatment_Results*”.

4.1.3 TRANSCRIPTOME – SECRETOME COMPARISON

The only protein that overlaps as differentially present in the secretome and differentially expressed is the metalloproteinase MMP10 (both considering the more restrictive and the less restrictive cut-offs in the transcriptomic data). Furthermore, it appears conflictingly regulated in both sets of data: whereas it is reduced in the secretome of responder samples, its expression appears increased in responder samples. Interestingly, in the secretome data, the control state does not present significant differences with the responder samples, but with the non-responder samples (the treatment increases MMP10 presence in non-responder samples).

In addition to the overlap between secretome and transcription lists, the interactions between the differentially expressed transcriptome gene set (with an ANOVA FDR q-value < 0.05) (Table 2) and the secretome differential protein set have been evaluated and results are shown in Table 3.

TABLE 3. INTERACTIONS BETWEEN TRANSCRIPTOME (WITH AN ANOVA FDR < 0.05) AND SECRETOME DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS.

Transcriptome		Secretome	
Uniprot ID	Protein Name	Uniprot ID	Protein Name
P16284	PECAM1	P61073	CXCR4 (fusin)
P09238	MMP10	P09237	MMP-7
		P03956	MMP-1
		Q9UHG2	ProSAAS
		P22466	Galanin
		Q14766	Latent TGF-beta bp1
Q12834	CDC20	O75496	GMNN
Q92990	GLMN	P08581	HGFR
		Q6EMK4	Vasorin

A total number of **10 interactions** have been found between the **4 out of 15 differentially expressed proteins** and **9 out of 127 differentially secreted proteins**. The only common protein in the secretome and transcriptome protein sets, the metalloproteinase **MMP10**, serves as the main link between both sets interacting with 5 different secreted proteins, namely the metalloproteinases MMP7 and MMP1, Galanin, latent TGF-B and ProSAAS. The differentially expressed **glomulin (GLMN)** interacts with two secretome proteins, the hepatocyte growth factor receptor (HGFR) and vasorin. Finally, **two more individual interactions** have been identified between the adhesion molecule PECAM1 and chemokine receptor CXCR4 (fusin), and between cell cycle proteins CDC20 and geminin (GMNN).

In addition, the interactions between the differential secretome proteins and the less strict list of differentially expressed transcriptome proteins (with a p-value < 0.01 in at least one test) have also been retrieved. **68 interactions have been detected** between 51 out of 127 differentially secreted proteins and 22 out of 113 differentially expressed proteins (including the 9 interactions described in Table 3). The complete list of detailed interactions is given in the “Protein_Interactions” sheet of the “DataTreatment_Results” excel file.

4.2 ENRICHMENT ANALYSIS

4.2.1 ENRICHMENT RESULTS_GSEA ANALYSIS

The level of expression of 13715 genes/proteins has been successfully transformed into the signal to noise ratio ranking parameter (according to GSEA software [7] and will be included in the GSEA enrichment analysis (“Transcriptomic_information _GSEA” sheet of the excel file “DataTreatment_Results”). On the other hand, 5601 genes have been left out since no signal (0.01) was detected for any sample; accordingly, it is not possible to calculate a valid ranking parameter, which makes them unfit for the GSEA analysis.

The list of resulting enriched pathways (p-value < 0.05) can be found on the “Up-regulated _Responders” and “Up-regulated _Non-Responders” sheet in the “Enrichment_Results” excel file. The detailed list of the proteins involved in each enriched process is delivered in the “resultsGSEA_detailedProteinPresence_enrichment” excel file. Note that no significantly enriched pathways have been found when multi-test correction has been applied for any of the cohorts. Accordingly, non-corrected p-values have used for results interpretation and discussion. The discussion included in this report has been conducted considering a more restrictive criterion: considering a p-value < 0.01.

A total number of **81 significantly enriched pathways** have been found for the **Celyvir responders cohort**, and **59 significantly enriched pathways** have been found in the **non-responders cohort**.

A bibliographic research has been done in order to contextualize the obtained results from a biological point of view, paying special attention to already known Celyvir-modulated processes [2], such as bone marrow-derived MSCs homing, adhesion and migration processes (especially pathways where CCR1, CXCR1 and CXCR4 molecules are involved) and immune modulation-related processes (with emphasis in IFN- γ and HLA-DR mediated pathways), but

also exploring other possible hypotheses. These cellular processes could hold the key to understanding the Celyvir response differences between cohorts, as suggested by previous research done by the client. The most relevant results are discussed in the following sections and mainly relate to the processes listed in Table 4.

TABLE 4. PROCESSES HIGHLIGHTED BY THE ENRICHMENT ANALYSIS

Viral infection and nucleic acid metabolism processes
Immune system-related processes
MSCs migration regulatory signalling pathways
Cell-to-cell adhesion
Mitosis
Metabolism
Stress response
Bone marrow fibrosis

VIRAL INFECTION AND NUCLEIC ACID METABOLISM PROCESSES

Viral replication requires from the cellular machinery to translate viral proteins and replicate the viral genetic material. Accordingly, it uses cellular nucleic acid metabolism mechanisms that have to be activated to allow viral replication.

The enrichment results show that the expression of the proteins involved in these processes is up-regulated in the responder cohort respect the non-responder cohort (Table 5). A variety of nucleic acid-related processes appear as representative of the responder cohort, including sets related to DNA transcription regulation mechanisms, DNA replication, DNA-RNA interaction, ribosomal RNA, RNA splicing and translation.

Additionally, sets directly related to viral biology (*positive regulation of viral release from host cell*, *viral budding via host ESCRT complex* and *viral life cycle*) appear up-regulated in responder samples.

TABLE 5. VIRAL INFECTION AND NUCLEIC ACID METABOLISM PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
lysine N-methyltransferase activity	6,16E-03	DNA; HISTONE	Responders
positive regulation of DNA-directed DNA polymerase activity	0,00E+00	MITOSIS; DNA	Responders
DNA replication	0,00E+00	MITOSIS; DNA	Responders
BRIP1	3,97E-03	MITOSIS; DNA	Responders
ATP-dependent helicase activity	6,11E-03	MITOSIS; DNA	Non-responders
nuclear lumen	3,94E-03	RNA; DNA	Responders
RNA-DNA hybrid ribonuclease activity	9,49E-03	RNA; DNA	Responders
RNA binding	0,00E+00	RNA	Responders
pre-snoRNP complex	0,00E+00	RNA	Responders
nucleolus	0,00E+00	RNA	Responders
translation	0,00E+00	RNA	Responders

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
negative regulation of transcription of nuclear large rRNA transcript from RNA polymerase I promoter	2,01E-03	RNA	Responders
histone pre-mRNA 3end processing complex	3,79E-03	RNA	Responders
spliceosomal complex	3,80E-03	RNA	Responders
spliceosomal snRNP assembly	3,91E-03	RNA	Responders
positive regulation of cap-independent translational initiation	5,98E-03	RNA	Responders
tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase activity	6,15E-03	RNA	Responders
positive regulation of viral release from host cell	4,17E-03	VIRAL INFECTION	Responders
viral budding via host ESCRT complex	5,60E-03	VIRAL INFECTION	Responders
viral life cycle	9,47E-03	VIRAL INFECTION	Responders

IMMUNE SYSTEM-RELATED PROCESSES

Immune system-related processes appear up-regulated in MSCs of both responder and non-responder patients. However, the class of processes identified for each cohort is different (Table 6).

Responder samples present IFN-related processes as well as T cell biology processes, both two well-known anti-virus response mechanisms; the results suggest on the one hand that the virus is correctly replicating, inducing a response to it, and on the other hand, that the responder patients possess a higher capacity to mount a cytotoxic response against infected cells.

There are processes related to innate immune system responses in both cohorts; the non-responders present a higher phagocytic capacity (*positive regulation of protein processing in phagocytic vesicle* and *macrophage differentiation*).

TABLE 6. IMMUNE SYSTEM-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
type I interferon binding	1,93E-03	IFN-mediated responses	Responders
type I interferon receptor activity	5,61E-03	IFN-mediated responses	Responders
negative regulation of T cell differentiation	0,00E+00	T cell responses	Responders
astrocyte activation	1,97E-03	T cell responses	Responders
positive regulation of T cell migration	5,74E-03	T cell responses	Responders
T cell mediated immunity	9,69E-03	T cell responses	Responders
nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 signaling pathway	1,94E-03	Innate immune system function	Responders
positive regulation of protein processing in phagocytic vesicle	2,02E-03	Innate immune system function	Non-responders
positive regulation of innate immune response	3,81E-03	Innate immune system function	Responders

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
myeloid cell differentiation	3,83E-03	Innate immune system function	Responders
macrophage differentiation	4,08E-03	Innate immune system function	Non-responders
mast cell activation	6,15E-03	Innate immune system function	Non-responders
interleukin-6 receptor binding	8,08E-03	Innate immune system function	Responders
diapedesis	4,06E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders
Monocyte adhesion	6,15E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders
Leukocyte extravasation at inflamed site	6,36E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders
Increased permeability of the vessels	8,49E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders
Leukocyte transmigration through blood vessel walls_skin infiltration	8,60E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders
Leukocyte transmigration through blood vessel walls	9,90E-03	Innate immune system migration and homing	Non-responders

Finally, non-responder patients present an up-regulation of immune cell migration processes. Most of them (*diapedesis*, *Monocyte adhesion*, *Leukocyte extravasation at inflamed site*, *Leukocyte transmigration through blood vessel walls_skin infiltration* and *Leukocyte transmigration through blood vessel walls*) contain PECAM1, which appear expressed in all the non-responder samples and as background (0.01) in all responder patients. Non-responder also show enhanced expression of proteins related to *increased permeability of the vessels*.

MSCs MIGRATION REGULATORY SIGNALLING PATHWAYS

The treatment appears to alter pathways associated with positive and negative regulation of MSCs migration in both cohorts (Table 7). These pathways include: HGF signaling [26], tachykinin signaling [27] (further supported by the upregulation of *bone formation* [28], *vasoconstriction* [29] and *operant conditioning* [30], all tachykinin-regulated processes – not shown in Table 7), Hippo signaling [31], NOTCH signaling [32, 33], Wnt signaling [34] and MAPK signaling [35].

TABLE 7. MSCs MIGRATION REGULATORY SIGNALING PATHWAYS DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
hepatocyte growth factor receptor binding	0,00E+00	Pro-migration, HGF	Non-responders
tachykinin receptor activity	1,96E-03	Pro-migration, Tachykinin	Responders
TEAD1	2,03E-03	Anti-migration, anti-Hippo	Non-responders
tachykinin receptor signaling pathway	2,06E-03	Pro-migration, Tachykinin	Responders
Notch binding	7,81E-03	Anti-migration, NOTCH	Responders
positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	8,39E-03	Pro-migration, WNT	Non-responders
regulation of MAPK cascade	8,44E-03	Pro-migration, MAPK	Non-responders

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
MAP kinase kinase kinase activity	9,62E-03	Pro-migration, MAPK	Responders

CELL-TO-CELL ADHESION

Both cohorts show representation of cell-to-cell adhesion-related sets: responders present desmosomes and gap junctions, and non-responder mainly present cytoskeleton restructuration processes (Table 8).

TABLE 8. CELL-TO-CELL ADHESION-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
Desmosome adhesion of oral and esophageal mucosa-non-keratinized cells	0,00E+00	Adhesion	Responders
Prostate luminal cell desmosome adhesion	0,00E+00	Adhesion	Responders
Gap junction	1,94E-03	Adhesion	Responders
Hyaluronan biosynthetic process	1,95E-03	Adhesion	Non-responders
Desmosome adhesion of oral and esophageal mucosa-keratinized cells	1,96E-03	Adhesion	Responders
Hemidesmosome assembly	7,49E-03	Adhesion	Non-responders
Desmosome	9,88E-03	Adhesion	Responders
positive regulation of cilium assembly	0,00E+00	Cytoskeleton	Non-responders
positive regulation of cytoskeleton organization	0,00E+00	Cytoskeleton	Non-responders
profilin binding	0,00E+00	Cytoskeleton	Non-responders

MITOSIS

An important number of mitosis-related sets appear up-regulated in MSCs of responder patients upon treatment respect MSCs from non-responder patients (Table 9). However, non-responder samples present up-regulation of the set *positive regulation of stem cell proliferation*.

TABLE 9. MITOSIS-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
positive regulation of stem cell proliferation	6,12E-03	Cell proliferation	Non-responders
Ctf18 RFC-like complex	0,00E+00	Mitosis	Responders
mitotic spindle midzone	3,75E-03	Mitosis	Responders
contractile ring	5,84E-03	Mitosis	Responders
exit from mitosis	5,92E-03	Mitosis	Responders
positive regulation of mitotic cytokinetic process	6,01E-03	Mitosis	Responders
regulation of mitotic nuclear division	9,42E-03	Mitosis	Responders
spindle midzone	9,73E-03	Mitosis	Responders

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
positive regulation of DNA-directed DNA polymerase activity	0,00E+00	Mitosis; DNA	Responders
DNA replication	0,00E+00	Mitosis; DNA	Responders
BRIP1	3,97E-03	Mitosis; DNA	Responders

METABOLISM

Both cohorts present metabolism-related sets, related to mainly to glycogen, proteins and lipids metabolism (Table 10).

Both responder and non-responder samples present up-regulated pathways related to glycogen reduction (either by direct catabolism in responders – mainly represented by AGL, which is consistently expressed in responder patients whereas it is not expressed in non-responders (0.01) –, or negative regulation of glycogenesis in non-responders).

Responder samples present a number of sets related to protein metabolism, including peptidase activity (APEH could be highlighted, as it is part of both peptidase-related sets, and is consistently expressed in responder patients whereas it is not expressed in non-responders (0.01)) and peptide and aminoacid metabolic processes.

On the other hand, non-responder samples present enhancement of lipid metabolism-related processes, either related to:

- isoprenoid production (*geranyltranstransferase activity, dimethylallyltranstransferase activity, farnesyl diphosphate biosynthetic process, geranyl diphosphate biosynthetic process*), which can be associated to enhanced production of steroids or to isoprenylation of proteins to enhance attachment to the cell membrane – isoprenylation has been related to osteogenic differentiation of MSCs [36] – however, the set *bone formation* appears upregulated in responder samples (not shown in Table 10);
- fatty acid and lipoprotein production and regulation; lipid accumulation is a known adipogenic differentiation stimulus for MSCs [37, 38].

TABLE 10. METABOLISM-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
peptide metabolic process	0,00E+00	Protein metabolism	Responders
serine-type endopeptidase activity	7,55E-03	Protein metabolism	Responders
tryptophan catabolic process	7,92E-03	Protein metabolism	Responders
omega peptidase activity	9,80E-03	Protein metabolism	Responders
glycogen catabolic process	5,92E-03	Glycogen metabolism	Responders
negative regulation of glycogen biosynthetic process	6,22E-03	Glycogen metabolism	Non-responders
geranyltranstransferase activity	2,04E-03	Lipid metabolism	Non-responders
dimethylallyltranstransferase activity	2,07E-03	Lipid metabolism	Non-responders
triglyceride homeostasis	2,08E-03	Lipid metabolism	Non-responders

ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
phospholipid transporter activity	4,09E-03	Lipid metabolism	Non-responders
very-low-density lipoprotein particle remodeling	5,74E-03	Lipid metabolism	Non-responders
long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process	6,22E-03	Lipid metabolism	Non-responders
NR5A2	6,32E-03	Lipid metabolism	Non-responders
farnesyl diphosphate biosynthetic process	8,11E-03	Lipid metabolism	Non-responders
REDUCED HDL LEVELS-HYPERTRIGLYCERIDEMIA	8,37E-03	Lipid metabolism	Non-responders
geranyl diphosphate biosynthetic process	9,62E-03	Lipid metabolism	Non-responders
glucuronate catabolic process to xylulose 5-phosphate	8,18E-03	Metabolism	Responders

STRESS RESPONSE

Both responder and non-responder samples present up-regulated pathways related to stress response (Table 11).

TABLE 11. CELLULAR STRESS RESPONSE-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

UPREGULATED ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
multicellular organismal response to stress	8,16E-03	Cellular stress	Non-responders
DNA damage induced protein phosphorylation	0,00E+00	Cellular stress DNA damage	Responders
regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	5,75E-03	Cellular stress DNA damage	Responders
ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS	0,00E+00	Cellular stress ER	Responders

BONE MARROW FIBROSIS

Non-responder samples present more upregulated proteins related to bone marrow fibrosis than responder samples (Table 12), including angiogenic factors (VEGFA, VEGFB, PDGFA), inflammatory cytokines (IL1A and IL1B, although TGFB1 appears higher in responders) and extracellular matrix remodeling factors (MMP14). These results suggest that MSCs from non-responder patients suffer alterations upon treatment that can compromise MSCs correct cellular function and impair their adenoviral vehicle capacity.

TABLE 12. BONE MARROW FIBROSIS- AND ANGIOGENESIS-RELATED PROCESSES DIFFERENTIALLY ALTERED BY TREATMENT IN MSCs OF RESPONDER VS. NON-RESPONDER PATIENTS

UPREGULATED ENRICHED PROCESS	p-value	RELATED PROCESS	COHORT
BONE MARROW FIBROSIS	6,59E-03	Bone marrow fibrosis	Non-responders
PRIMARY_MYELOFIBROSIS	8,79E-03	Bone marrow fibrosis	Non-responders
PURPURA	0,00E+00	Pathway VEGF-PDGF	Non-responders
positive regulation of cell proliferation by VEGF-activated platelet derived growth factor receptor signaling pathway	4,07E-03	Pathway VEGF-PDGF	Non-responders

4.2.2 BIOLOGICAL RELATIONSHIP BETWEEN GENE EXPRESSION ENRICHMENT RESULTS AND SECRETOME DATA

It has been evaluated whether the proteins differentially present in the secretome of responder and non-responder patients' MSCs were part of the most significant enrichment results ($p\text{-value} < 0.01$), and 27 out of the 127 candidates were found to participate in at least one of the enriched sets (12 out of 81 enriched pathways in the responders cohort and 9 out of 59 enriched pathways in the non-responders cohort).

TABLE 13. PROTEINS DIFFERENTIALLY PRESENT IN THE SECRETOME THAT PARTICIPATE IN SETS ENRICHED IN RESPONDERS SAMPLES. THE RED BACKGROUND ON COLUMN “*RESP (↑) vs. NON-RESP (↓) IN SECRETOME*” INDICATES THAT THE DIRECTION OF THE ENRICHMENT (IN THIS CASE, RESPONDERS) IS OPPOSED TO THE PRESENCE CHANGES OF THE PROTEIN IN THE SECRETOME (I.E. DOWNREGULATION OR MORE PRESENT IN NON-RESPONDERS)

Set Name	Gene Names	S2N ratio in transcriptome	Resp (↑) vs. Non-resp (↓) in secretome
BONE FORMATION	IL6	0,79	↑
BONE FORMATION	TNFRSF11A	0,50	↑
BONE FORMATION	TNFRSF11B	0,08	↓
BONE FORMATION	CSF1	-0,37	↓
BONE FORMATION	SFRP4	0,21	↓
interleukin-6 receptor binding	IL6	0,79	↑
myeloid cell differentiation	THPO	-0,05	↓
nucleolus	GRB2	-0,95	↑
nucleolus	ANG	0,50	↓
nucleolus	NF1	0,68	↓
OXIDATIVE STRESS_HEART_FAILURE	IL6	0,79	↑
peptide binding	ANG	0,50	↓
positive regulation of T cell migration	TNFRSF14	0,86	↓
positive regulation of vasoconstriction	ICAM1	0,10	↓
RNA binding	GRB2	-0,95	↑
RNA binding	GRN	-0,13	↓
serine-type endopeptidase activity	MMP1	1,26	↓
serine-type endopeptidase activity	MMP10	4,98	↓
TISSUE INVASION AND METASTASIS_CCRCC	IL6	0,79	↑
TISSUE INVASION AND METASTASIS_CCRCC	TIMP2	0,77	↓
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	ACVR1B	-0,10	↑
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	TGFBR2	0,15	↓

17 proteins differentially present in the secretome of responder and non-responder patients' MSCs were part of sets enriched in **responders samples** (Table 13). The presence differences of several secretome proteins appear in contradiction with the transcriptome enrichment results (14 out of 22 protein-set matches), including the *bone formation*, *myeloid cell differentiation*, *nucleolus*, *peptide binding*, *positive regulation of T cell migration*, *positive*

regulation of vasoconstriction, serine-type endopeptidase activity and transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity.

On the other hand, 15 proteins differentially present in the secretome of responder and non-responder patients' MSCs were part of sets enriched in **non-responders samples** (Table 14). Also in this case, almost half of the secretome proteins show expression changes in a direction that contradicts those defined for the proteins in the enriched datasets (9 out of 20 protein-set matches), including the *diapedesis* and *regulation of MAPK cascade*.

TABLE 14. PROTEINS DIFFERENTIALLY PRESENT IN THE SECRETOME THAT PARTICIPATE IN SETS ENRICHED IN NON-RESPONDERS SAMPLES. THE RED BACKGROUND ON COLUMN "*RESP (↑) VS. NON-RESP (↓) IN SECRETOME*" INDICATES THAT THE DIRECTION OF THE ENRICHMENT (IN THIS CASE, NON-RESPONDERS) IS OPPOSED TO THE PRESENCE CHANGES OF THE PROTEIN IN THE SECRETOME (I.E. UPREGULATION OR MORE PRESENT IN RESPONDERS)

Set Name	Gene Names	S2N ratio in transcriptome	Resp (↑) vs. Non-resp (↓) in secretome
BONE MARROW FIBROSIS	PDGFA	-0,47	↓
diapedesis	FER	0,18	↑
INCREASED PERMEABILITY OF THE VESSELS	IL4	0,50	↓
INCREASED PERMEABILITY OF THE VESSELS	CSF1	-0,37	↓
INCREASED PERMEABILITY OF THE VESSELS	IL10	-0,58	↑
INCREASED PERMEABILITY OF THE VESSELS	VEGFC	-0,63	↑
LEUKOCYTE EXTRAVASATION AT INFLAMMED SITE	ICAM1	0,10	↓
macrophage differentiation	CSF1	-0,37	↓
MACULAR_DEGENERATION	PDGFA	-0,47	↓
MACULAR_DEGENERATION	ICAM1	0,10	↓
MACULAR_DEGENERATION	TEK	-0,58	↓
MACULAR_DEGENERATION	AGER	0,03	↓
MACULAR_DEGENERATION	TNFRSF10A	-0,39	↑
MACULAR_DEGENERATION	IL6	0,79	↑
MACULAR_DEGENERATION	IL10	-0,58	↑
positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	SFRP4	0,21	↓
PRIMARY_MYELOFIBROSIS	PDGFA	-0,47	↓
regulation of MAPK cascade	MSTN	-0,58	↑
regulation of MAPK cascade	INHBC	-0,58	↑
regulation of MAPK cascade	GRB2	-0,95	↑

The results show that there are contradictions on the levels of expression and actual presence in the secretome of proteins involved in important processes for MSCs function. It is important to keep in mind that each dataset comes from a different subcellular location (cells and extracellular space) and measures different molecular entities (mRNA and proteins), and that each dataset may be reflecting different levels of cell function regulation. Furthermore, each biological process takes place in a different location (e.g. viral replication is an intracellular process, whereas immune system responses may be more reflected in

extracellular space). These findings suggest that there may be feedback regulatory mechanisms and interconnected regulatory networks that help to finely tune MSCs biology and response to Celyvir. Some interesting examples could be:

- *bone formation*, related to MSCs differentiation, that appear up-regulated in the transcriptome of responders samples, although some of the proteins involved in it appear to be less present in the secretome of responder than non-responder patients' MSCs (TNFRSF11B, CSF1, SFRP4) – furthermore other pathways related to differentiation fate of MSCs have appeared up-regulated in non-responder MSCs transcriptome (lipid metabolism-related pathways);
- *regulation of MAPK cascade*, related to MSCs migration capacity through NCAM [35], appear up-regulated in the transcriptome of non-responders samples; however, all three differentially present proteins between the secretome of responder and non-responder samples appear to be more present in responders' secretome than in non-responders. These results may suggest that MAPK kinase signaling pathway is activated by regulatory proteins (MSTN, INHBC – Activin C in secretome –, GRB2) in responder MSCs (as suggested by the enriched set *MAP kinase kinase kinase activity*, Table 7), inducing MSCs migration; however, at the transcriptome level, the expression of genes involved in MAPK signaling regulation is lower in responders, probably as a feedback loop.

4.3 RESULTS GRAPHICAL REPRESENTATION

A cytoscape¹ [39] session named “CELY360_Enrichmentnetwork.cys”² has been generated including all the enriched sets with a p-value < 0.01, the relationships among them – represented as the overlap of proteins (%), and the presence of differentially expressed genes/proteins (non-corrected p-value < 0.01) or differentially present in the secretome proteins in the enriched sets.



FIGURE 1. “CELY360_ENRICHMENTNETWORK.CYS” VISUAL LEGEND

¹ Open-source network visualization software downloadable from:
<http://www.cytoscape.org/download.php>

² When opening the network with cytoscape software, the user may need to select the Style named “ENRICHMENT GSEA FORMAT” to correctly see the format according to the provided legend.

This network allows to generate network images (subnetworks) of the processes of most interest, as for example viral processes (Figure 2) or MAPK kinase kinase activity (Figure 3). Other example subnetworks have been generated and are stored in the cytoscape session.

According to the project proposal (2018_P0122), one representation with 1 round of revision will be generated upon client's request.

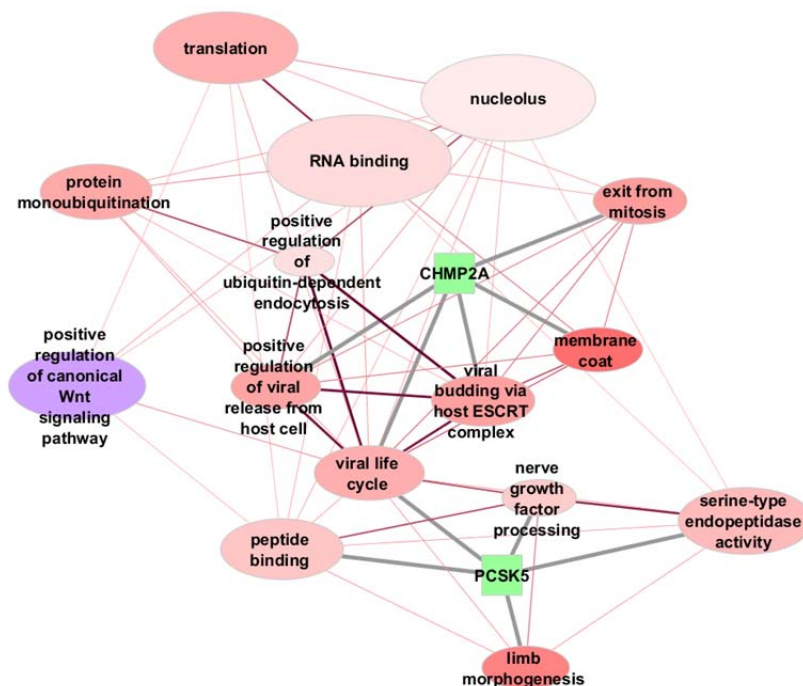


FIGURE 2. NETWORK OF SETS AND DIFFERENTIALLY EXPRESSED/SECRETED PROTEINS RELATED TO VIRAL PROCESSES.

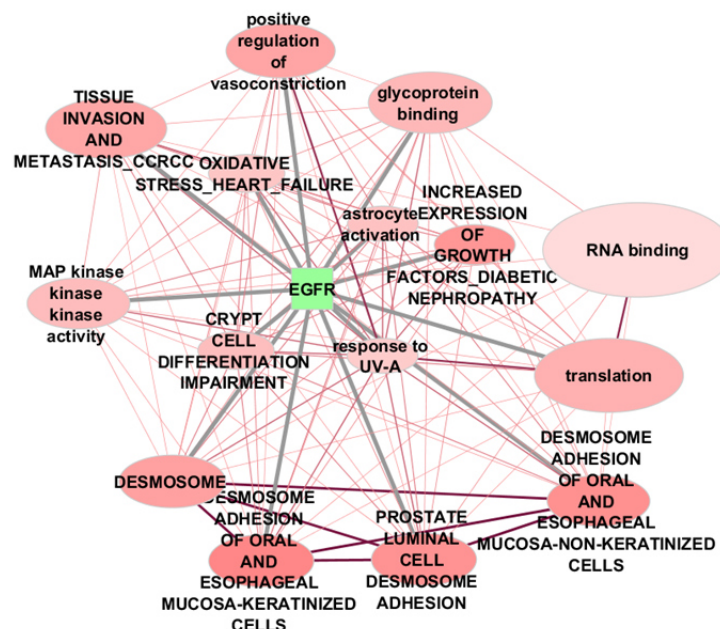


FIGURE 3. NETWORK OF SETS AND DIFFERENTIALLY EXPRESSED/SECRETED PROTEINS RELATED TO MAP KINASE KINASE KINASE ACTIVITY.

5 KEY FINDINGS

STATISTICAL ANALYSIS

- **SECRETOME DATA:** A total of **127 proteins** have been selected as candidates to explain differences between responder and non-responder patients, since they present statistically significant presence differences in presence in the secretome of both cohorts, or are consistently present in responders, whereas consistently absent in non-responders. Of these proteins:
 - o **3 proteins are up-regulated only in responder patients** when compared to the controls: **vasorin, Latent TGF-beta bp1 and FER**
 - o **15 proteins are up-regulated only in non-responder patients** when compared to the controls: **PDGF-AB (formed by PDGFA and PDGFB), Eotaxin / CCL11, RAGE, BMP-5, LIF R alpha, IL-4, ApoA4, TGF-beta RII, MMP-10, MBL-2, MMP-7, IL-16, TGF-beta 2 and M-CSF.**
 - **TRANSCRIPTOME DATA:** Due to the low number of significant results, two cut-off criteria have been applied:
 - o **15 gene products** have been identified as differentially expressed applying multi-test correction ($FDR < 0.05$) – Table 2.
 - o **113 gene products** have been identified as differentially expressed considering non-corrected p-values ($p\text{-value} < 0.01$) for at least one of the tests performed.
- The default ranking parameter (signal-to-noise ratio) has been employed for the GSEA.
- **TRANSCRIPTOME – SECRETOME COMPARISON:**
 - o Only **MMP10** appears as differentially expressed/present (and with contradictory signal) in both datasets.
 - o **68 interactions have been detected** between 51 out of 127 differentially secreted proteins and 22 out of 113 differentially expressed proteins (non-corrected $p\text{-value} < 0.01$).

ENRICHMENT ANALYSIS

- A total of **140 enriched sets** (non-corrected $p\text{-value} < 0.01$) have been found among the transcriptome data: 81 up-regulated in responder patients and 50 up-regulated in non-responder patients.
- The results suggest that:
 - o **Responder patients** present increased expression of viral replication, viral protein production and mitosis-related genes, pointing towards a **more efficient viral replication** in this cohort.
 - o **Responder patients** present more expression of proteins involved in processes of immune response to virus, suggesting that the responder patients possess a **higher capacity to mount a cytotoxic response against infected cells.**

- Both cohorts present metabolism-related sets enriched; **non-responder patients** present increases in **lipid metabolism process**, which can regulate **MSCs differentiation and fate**.
- **Non-responder patients** present enrichment in processes related to **bone marrow fibrosis and angiogenesis**, suggesting that **MSCs function in these patients could be compromised**.
- **Both cohorts** present alterations in **pathways known to regulate MSCs migration capacity**.
- Several of the differentially present proteins in the secretome that are present in the enriched sets are in contradiction with the enrichment results. Since protein secretion is a regulated process, protein level changes do not need to strictly correlate inside and outside the cell. According to that, is important to keep in mind the different levels of cell biology when exploring the next steps.

6 RECOMMENDED NEXT STEPS

According to the obtained results, we recommend the:

- Evaluation of the lists of differential candidates both in secretome and transcriptome data, in order to identify interesting candidates to explain differences in MSCs biology between Celyvir responder and non-responder patients.
 - The performance of the Objective 2 of proposal 2018_P0122 can help contextualize these candidates in selected biological processes.
 - We recommend the experimental validation with an alternative technique (e.g. PCR) of the most promising candidates (e.g. MMP10, or the proteins highlighted in Table 1, Table 2 or Table 3).
- Experimental validation of the processes highlighted in the present report, specially those not previously reported as differential between Celyvir responder and non-responder patients.
- Evaluation of the results of the enrichment analysis through the use of the “*Enrichement_results*” excel file and cytoscape session (“*CELY360_Enrichmentnetwork.cys*”) provided, in order to consider the relevance of other identified processes, not highlighted in the present report.
- Generation of graphical representations using the “*CELY360_Enrichmentnetwork.cys*” to support the obtained results and raised hypotheses.
 - According to the project proposal (2018_P0122), one representation with 1 round of revision will be generated upon client’s request.

7 BIBLIOGRAPHY

1. Louis, C.U. and J.M. Shohet, *Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy*. Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 49-63.
2. Melen, G.J., et al., *Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells*. Cancer Lett, 2016. **371**(2): p. 161-70.
3. UniProt Consortium, T., *UniProt: the universal protein knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(5): p. 2699.
4. Gibbons, J.D., *Nonparametric Statistical Inference*. New York: Marcel Dekker.
5. Hollander, M., and D. A. Wolfe, *Nonparametric Statistical Methods*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
6. Benjamini, Y.H., Yosef *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society. **Series B. 57 (1): 289–300. MR 1325392**.
7. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
8. UniProt, C., *UniProt: a hub for protein information*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D204-12.
9. Kanehisa, M., et al., *KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D353-D361.
10. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 27-30.
11. Kanehisa, M., et al., *Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D199-205.
12. Kanehisa, M., et al., *KEGG as a reference resource for gene and protein annotation*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D457-62.
13. Valls, R., et al., *ANAXOMICS' methodologies -Understanding the complexity of biological processes-*. White paper, 2013.
14. Whirl-Carrillo, M., et al., *Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(4): p. 414-7.
15. Frolkis, A., et al., *SMPDB: The Small Molecule Pathway Database*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D480-7.
16. Han, H., et al., *TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11432.
17. Milacic, M., et al., *Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome*. Cancers (Basel), 2012. **4**(4): p. 1180-211.
18. Croft, D., et al., *The Reactome pathway knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D472-7.
19. Kerrien, S., et al., *The IntAct molecular interaction database in 2012*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D841-6.
20. Orchard, S., et al., *The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D358-63.
21. Stark, C., et al., *BioGRID: a general repository for interaction datasets*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D535-9.
22. Chatr-Aryamontri, A., et al., *The BioGRID interaction database: 2015 update*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D470-8.

23. Keshava Prasad, T.S., et al., *Human Protein Reference Database--2009 update*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D767-72.
24. Licata, L., et al., *MINT, the molecular interaction database: 2012 update*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D857-61.
25. Roy Choudhury, S., et al., *Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 782020.
26. Vogel, S., et al., *Hepatocyte growth factor-mediated attraction of mesenchymal stem cells for apoptotic neuronal and cardiomyocytic cells*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(2): p. 295-303.
27. Dubon, M.J. and K.S. Park, *The mechanisms of substance P-mediated migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cell-like ST2 cells*. Int J Mol Med, 2016. **37**(4): p. 1105-11.
28. Zhang, Y.B., et al., *Local injection of substance P increases bony formation during mandibular distraction osteogenesis in rats*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2014. **52**(8): p. 697-702.
29. Lippe, I., C.H. Wachter, and P. Holzer, *Neurokinin A-induced vasoconstriction and muscular contraction in the rat isolated stomach: mediation by distinct and unusual neurokinin2 receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **281**(3): p. 1294-302.
30. Hasenohrl, R.U., et al., *Comparison of neurokinin substance P with morphine in effects on food-reinforced operant behavior and feeding*. Physiol Behav, 1994. **55**(3): p. 541-6.
31. Li, L., et al., *[Under-expression of LATS1 promotes the differentiation, proliferation and migration of mesenchymal stem cells by inhibition the Hippo signaling pathway in vitro]*. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2017. **29**(8): p. 731-737.
32. Xie, J., et al., *Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells*. Cell Immunol, 2013. **281**(1): p. 68-75.
33. Liu, X., et al., *SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion*. Protein Cell, 2011. **2**(10): p. 845-54.
34. Shang, Y.C., et al., *Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(11): p. 1761-74.
35. Shi, Y., et al., *Neural cell adhesion molecule modulates mesenchymal stromal cell migration via activation of MAPK/ERK signaling*. Exp Cell Res, 2012. **318**(17): p. 2257-67.
36. Duque, G., C. Vidal, and D. Rivas, *Protein isoprenylation regulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: effect of alendronate, and farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(5): p. 1109-18.
37. Chen, Q., et al., *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?* Cell Death Differ, 2016. **23**(7): p. 1128-39.
38. Ahmed, A.U., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells loaded with an oncolytic adenovirus suppress the anti-adenoviral immune response in the cotton rat model*. Mol Ther, 2010. **18**(10): p. 1846-56.
39. Shannon, P., et al., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003. **13**(11): p. 2498-504.

Anexo 10 – Segundo análisis proporcionado por Anaxomics (*Deliverable 2*).



IDENTIFICATION OF MSCs' KEY GENES AND BIOMARKERS ASSOCIATED WITH THE PATIENT RESPONSE TO CELYVIR, BY MEANS OF SYSTEMS BIOLOGY

-Deliverable 2-

Client Name:	Dr. Manuel Ramirez Orellana_Fundación Oncohematología Infantil
Date of version:	20 th November 2018
Date of submission:	21 th November 2018
Project Code:	P-21_2018
Prepared by:	Guillem Méndez - Anaxomics
e-mail:	cely360@anaxomics.com

CONTENT

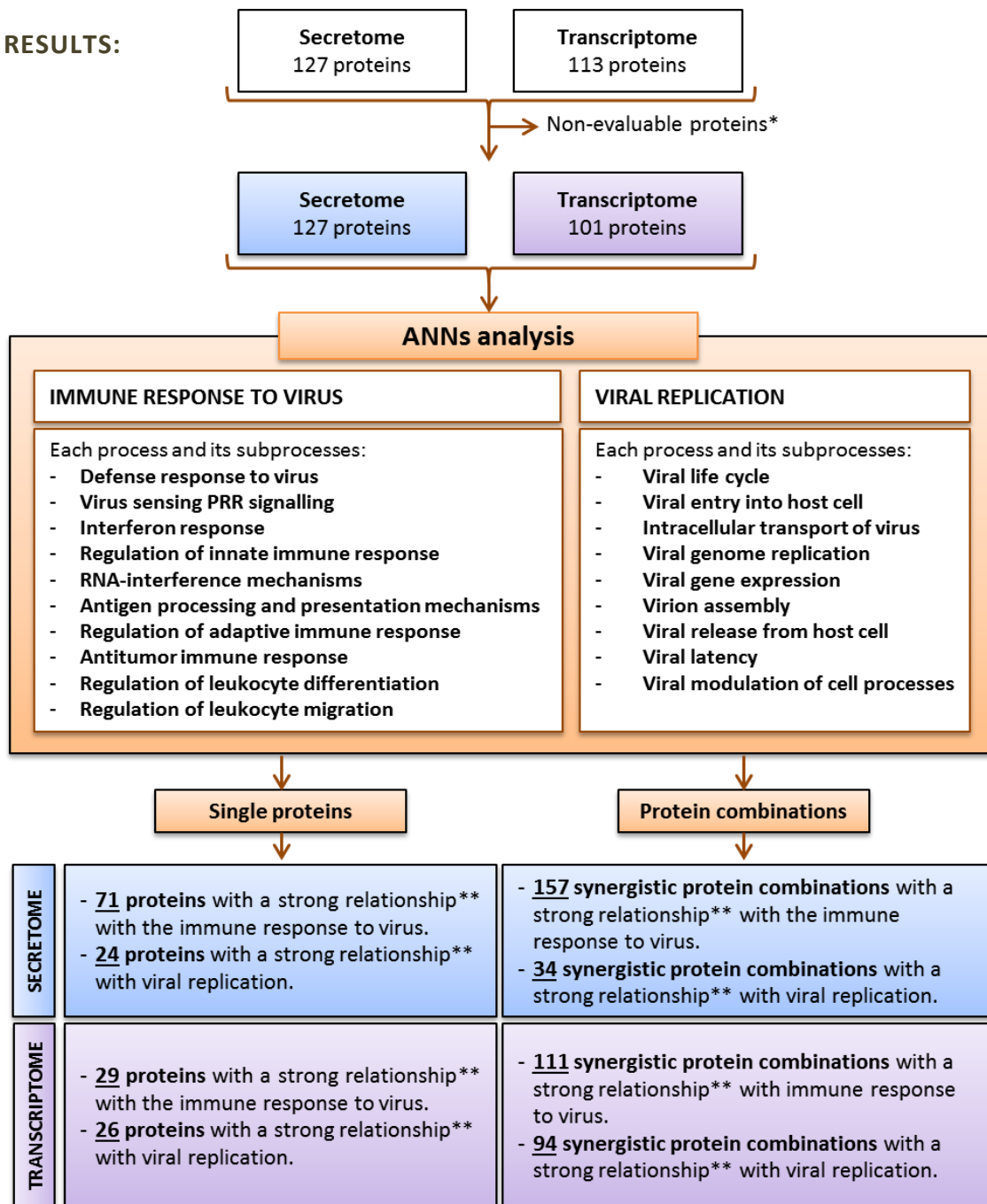
1	Executive summary	4
2	Introduction and Objectives.....	7
3	Materials and Methods.....	7
4	Results	8
4.1	Relationship with immune response to virus.....	9
4.1.1	Defense response to virus.....	10
4.1.2	Virus sensing PRR signalling	12
4.1.3	Interferon response.....	14
4.1.4	Regulation of innate immune response.....	19
4.1.5	RNA-interference	22
4.1.6	Antigen processing and presentation	23
4.1.7	Regulation of adaptive immune response	24
4.1.8	Antitumor immune response	27
4.1.9	Regulation of leukocyte differentiation	28
4.1.10	Regulation of leukocyte migration	30
4.2	Relationship with viral replication	34
4.2.1	Viral life cycle	35
4.2.2	Viral entry into host cell	37
4.2.3	Intracellular transport of virus	39
4.2.4	Viral genome replication	39
4.2.5	Viral gene expression	42
4.2.6	Virion assembly	43
4.2.7	Viral release from host cell.....	45
4.2.8	Viral latency.....	46
4.2.9	Viral modulation of cell processes	46
4.3	Protein combination analysis	48
4.4	Graphical representation:	50
5	Key findings	52
5.1	Secretome differential proteins	52
5.2	Transcriptome differential proteins.....	54

6	Recommended next steps.....	59
7	Bibliography	60
8	Annexes	61
8.1	Annex 1: Excel file legend.....	61
8.2	Annex 2: Secretome alternative key findings.....	65

1 EXECUTIVE SUMMARY

OBJECTIVE: The main goal of this project is to **identify and prioritize the MSCs secretome and transcriptome-derived gene and protein candidates based on their mechanistic association with the immune response to virus and viral replication**, evaluated by means of systems biology-based mathematical models and Artificial Neural Networks (ANNs) analysis.

RESULTS:



Results found in the excel files «ANNResults_ImmuneResponseToVirus» and «ANNResultsViralReplication».

FIGURE 1. SCHEME OF THE STEPS AND RESULTS OF THE PROJECT. *SOME PROTEINS CANNOT BE EVALUATED BY ANNS BECAUSE THERE ARE NO RELIABLE PROTEIN-PROTEIN LINKS AROUND THEM, OR THERE ARE TOO MANY (STICKY PROTEINS THAT PERTURB THE SIGNAL FLOW), WHICH IMPLIES THAT THEY CANNOT BE INCLUDED IN ANAXOMICS' NETWORK. ** RELATIONSHIPS WITH AN ANN SCORE RANGING BETWEEN VERY HIGH AND MEDIUM-HIGH ARE CONSIDERED STRONG RELATIONSHIPS.

KEY FINDINGS:**SECRETOME DIFFERENTIAL PROTEINS**

- ✓ 75 differentially expressed proteins from the supernatant (secretome) of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders and non-responders have shown a strong relationship¹ with the **immune response to virus** (71 proteins, summary in Table 1) and/or **viral replication** (24 proteins, summary in Table 2).

TABLE 1. SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Regulation of leukocyte migration	44%	20%	24%
Regulation of adaptive immune response	31%	14%	17%
Virus sensing PRR signalling	23%	13%	10%
Regulation of innate immune response	21%	7%	14%
Regulation of leukocyte differentiation	15%	4%	11%
Interferon response	13%	10%	3%
Defense response to virus	8%	4%	4%
Antigen processing and presentation mechanisms	6%	1%	4%

TABLE 2. SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED TO VIRAL REPLICATION PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Related process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Viral genome replication	35%	25%	13%
Viral life cycle	29%	17%	13%
Viral entry into host cell	25%	8%	17%
Viral gene expression	17%	8%	8%
Viral modulation of cell processes	8%	0%	8%
Virion assembly	4%	0%	4%

- ✓ **IL6, IL10, IL6R, IL4, CCL2 and FGA** are highlighted for the strength of their relationship with the **immune response to virus** (strongly related to at least 6 different subprocesses).
- ✓ **GMNN, MMP12, FGB, ICAM1 and TNFRSF10A** are highlighted for the strength of their relationship with **viral replication** (strongly related to at least 2 different subprocesses).
- ✓ In addition, there are **24 immune response strongly related proteins** (Table 45) and **18 viral replication-related processes strongly related proteins** (Table 46) that have not been **previously implicated in these processes** according to the consulted Gene Ontology Consortium Database [1, 2]. These proteins are of special interest, due to their potential novel role in the studied processes, which could be determining the response to Celyvir.

¹ Proteins with an ANN Score ranging between a very high and a medium-high relationship are considered proteins with a strong relationship.

TRANSCRIPTOME DIFFERENTIAL PROTEINS

- ✓ 44 differentially expressed proteins detected in the transcriptome of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders and non-responders have shown a strong relationship with the **immune response to virus** (29 proteins, summary in Table 3) and/or **viral replication** (26 proteins, summary in Table 4).

TABLE 3. GENE CANDIDATES MOST STRONGLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Interferon response	38%	14%	24%
Regulation of leukocyte migration	28%	10%	17%
Regulation of leukocyte differentiation	24%	14%	10%
Regulation of adaptive immune response	17%	10%	7%
Defense response to virus	14%	3%	10%
Virus sensing PRR signalling	14%	3%	10%
Regulation of innate immune response	10%	3%	7%
RNA interference mechanisms	7%	3%	3%

TABLE 4. GENE CANDIDATES MOST STRONGLY RELATED TO VIRAL REPLICATION PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Related process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Viral gene expression	35%	4%	31%
Viral genome replication	35%	27%	8%
Viral life cycle	27%	15%	12%
Viral entry into host cell	15%	8%	8%
Virion assembly	8%	8%	0%
Viral modulation of cell processes	8%	0%	8%
Viral release from host cell	4%	4%	0%

- ✓ **TRAF3, MAVS, PCBP2, FASN and NDRG1** are highlighted for their strong relationship with the **immune response to virus** (strongly related to at least 3 different subprocesses).
- ✓ **CHMP2A, CLEC5A, XBP1, BMPR1B, MAVS, RAB29, TRAF3 and MEMO1** are highlighted for their strong relationship with **viral replication** (strongly related to at least 2 different subprocesses).
- ✓ In addition, there are **21 immune response strongly related proteins** (Table 49) and **16 viral replication-related processes strongly related proteins** (Table 50) that have not been **previously implicated in these processes** according to the consulted Gene Ontology Consortium Database [1, 2].

Further research on the strongly related proteins could be key for the elucidation of factors associated with the response to Celyvir in neuroblastoma patients.

The protein candidates not described previously as effectors are of special interest, due to their potential novel role in the studied processes, which could provide added value to the performed research.

2 INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Neuroblastoma is a developmental tumor of young children arising from the embryonic sympathoadrenal lineage of the neural crest. Currently neuroblastoma is the primary cause of death from pediatric cancer for children between the age of 1 and 5 years and accounts for approximately 13% of all pediatric cancer mortality [3].

Celyvir, an innovative therapy based on autologous marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) carrying an oncolytic adenovirus, has been tested by Dr. Manuel Ramirez and his team for treating children with advanced metastatic neuroblastoma. Interestingly, they found differences between patients who responded versus those who did not when analysing their respective MSCs, at the expression levels of adhesion molecules (CCR1, CXCR1 and CXCR4) and in migration capacities in transwell assays, and in immune-related molecules (IFN γ , HLA-DR). These results suggest interpatient differences in the homing and immune modulation capacities of the therapy administered [4].

On the previous objective of this project a systems biology-based enrichment analysis of the expression level of proteins from the supernatant (secretome) and the gene expression (mRNAseq, transcriptome) of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders (n=4) and non-responders (n=3) was performed. The results indicated a relationship between this data and several processes implicated in the immune response to virus and viral replication.

The present objective of the project is to achieve better understanding of the molecular events that explain the clinical response to Celyvir through the analysis of the functional relationship between the differentially expressed genes and secreted proteins (in responder vs. non responders) and the immune response to virus and viral replication, through an systems biology and artificial neuronal networks (ANNs)-based approach.

3 MATERIALS AND METHODS

The execution of this project started with the selection of the secretome and transcriptome data that were to be analysed, based on the analyses performed in the previous objective, in order to define the differentially expressed proteins between responders and non-responders. In parallel, the immune response to virus and viral replication processes were defined at molecular level through bibliography and database revision (Gene Ontology Consortium database [1, 2]).

Then, systems biology-based mathematical models were generated and evaluated by means of Artificial Neural Networks (ANNs) analysis [5] in order to prioritize the differential proteins and protein combinations according to their potential relationship with immune response to virus and viral replication.

A detailed description of the methods applied is included in the “Methodology” document.

4 RESULTS

The possible relationship between the differentially expressed proteins detected in the comparison between patients with a positive response to Celyvir treatment (responders) and those without a response (non-responders) and the **immune response to virus** and **viral replication** has been evaluated by means of an artificial neuronal networks (ANNs) analysis [5]. Both secretome and transcriptome data have been taken into account in this evaluation.

The list of proteins selected for both the transcriptome and secretome analysis were obtained in the previous objective of this project (Deliverable 1):

- All differentially expressed secretome proteins have been evaluated (127 proteins). Additionally, their real status as secreted proteins has been checked and taken into account in the following sections (find secretome key findings evaluating only those proteins known to be secreted, according to information provided by public databases, in Annex 2).
- Only transcriptome proteins that have obtained a significant non-corrected p-value lower than 0.01 (**p-value <0.01**) in one of the multiple tests for their differential expression have been evaluated (115 proteins).

Note that the 5.8 % of the proteins (more precisely, 14 proteins of the transcriptome data) cannot be evaluated by ANNs because there are no reliable protein-protein links around them, which implies that they cannot be included in Anaxomics' network. These proteins are marked with “-” in the “ANN value” columns of the excel files “ANNResults_ImmuneResponseToVirus” and “ANNResults_ViralReplication”. Table 5 specifies the number of differentially expressed proteins considered in each comparison and how many of them have been evaluated by ANNs.

TABLE 5. NUMBER OF HUMAN DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS IDENTIFIED FOR THE SECRETOME AND TRANSCRIPTOME DATA AND HOW MANY OF THEM HAVE BEEN EVALUATED BY ANNs.

Data	# proteins	# proteins evaluated by ANNs	% of proteins evaluated
Secretome	127	127	100%
Transcriptome	113	101	89,4%

ANNs evaluate the relationships among protein sets or regions inside the network providing a predictive score that quantifies the probability of the existence of a functional relationship between the evaluated regions. Each score is associated with a p-value that describes the probability of the result being a true positive result. Aiming to facilitate the understanding of the results, the ranking score has been divided in five categories (Table 6).

According to this classification, it has been defined that proteins are predicted to:

- have a “strong relationship” with the processes under study if they present a very high, high or medium-high predicted relationship with any of the subprocesses used in the characterization, and have been considered good candidates;

- have a “medium relationship” with the processes under study if they present at least medium predicted relationship with any of the subprocesses used in the characterization;
- have “low or no relationship” with the processes under study if they present low predicted relationship with all the subprocesses used in the characterization.

TABLE 6. CATEGORY DIVISION OF ANN SCORE ACCORDING TO PROBABILITY OF BEING A TRUE POSITIVE RESULT

ANN value	ANN score	Associated p-value
>92	VERY HIGH	<0,01
78-92	HIGH	0,01-0,05
74-78	MEDIUM-HIGH	0,05-0,075
38-74	MEDIUM	0,075-0,25
<38	LOW	>0,25

The following sections detail the predicted relationships assessed between the secretome and transcriptome proteins and the immune response to virus and viral replication. It has also been indicated whether the proteins are defined as effectors of the processes according to GO Database [1, 2] definitions.

4.1 RELATIONSHIP WITH IMMUNE RESPONSE TO VIRUS

The possible relationship between the secretome and transcriptome data and 10 different cellular and molecular processes included in the immune response to virus, and associated GO-based subprocesses [1, 2], have been assessed (details on the identification and selection of each process and subprocess is detailed in the *Methodology* document, and the “Characterization_proposal” Word file and “Characterization_proposal_proteins” Excel file [delivered the 19th October 2018]).

Each process of the immune response to virus has been evaluated in detail in the following sections.

Note: The complete list of results for this evaluation can be found in the “Secretome” and “Transcriptome” sheets, respectively, of the “ANNResults_ImmuneResponsetoVirus” Excel file.

Annex 1 contains a legend to facilitate interpretation.

4.1.1 DEFENSE RESPONSE TO VIRUS

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 57 proteins (44,9%) display a low or no relationship with the *defense response to virus* and *regulation of defense response to virus* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 70 proteins (55,1%) are somehow related to the one or both sub-processes included in its characterization:

- Six proteins are predicted to have a strong relationship with defense response to virus (Table 7):

- ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with the studied processes.
- ✓ **CXCL10** (IP-10) has displayed a high relationship with the *defense response to virus* process and is listed as one of its effector proteins. This secreted protein is found significantly downregulated among the responders.

The metalloproteinase **MMP12**, downregulated in the responders' cohort, has displayed a high relationship with the *regulation of defense response to virus* and is listed as an effector of this process.

- ✓ Interleukin 6 (**IL-6**) has achieved a medium-high relationship and is also a known effector of the *defense response to virus*. Interleukin 6 is upregulated among the patients showing a positive response to Celyvir.

Additionally **IL-6** and 3 additional proteins (**IL-24**, **CNTF** and **IL-10**) have achieved a medium-high relationship score with the *regulation of defense response to virus* process, although **not** being listed among its **effectors in GO databases**. CNTF, IL-6 and IL-10 are upregulated in the responders' cohort, while IL-24 is downregulated in the same cohort.

- The remaining 64 proteins have shown a medium relationship with the *defense response to virus* and/or the *regulation of defense response to virus* processes. Of note, none of them are effector proteins.

TABLE 7. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH DEFENSE RESPONSE TO VIRUS SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P02778	CXCL10	↓	✓	86,13	defense response to virus	✓
P05231	IL6	↑	✓	77,68	defense response to virus	✓
			✗	76,79	regulation of defense response to virus	✓
P39900	MMP12	↓	✓	86,43	regulation of defense response to virus	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q13007	IL24	↓	×	77,65	regulation of defense response to virus	✓
P26441	CNTF	↑	×	77,40	regulation of defense response to virus	✓
P22301	IL10	↑	×	75,27	regulation of defense response to virus	✓

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 69 proteins (68,3%) display a low or no relationship with both *defense response to virus* and *regulation of defense response to virus* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 32 proteins (31,7%) are somehow related to the one or both of these processes:

- Four proteins are predicted to have a strong relationship with defense response to virus (Table 8):

- ✓ No transcriptome protein has displayed a very high relationship with these processes.
- ✓ **PCBP2** has shown a high relationship with the defense response to virus and is listed as an effector protein of the *defense response to virus* process. Of note, this protein's mRNA levels are downregulated among the responders cohort.

Additionally **PCBP2**, and also proteins **MAVS** and **TRAF3**, have displayed a high relationship with *regulation of defense response to virus*, a process for which all 3 are listed as effectors. The mRNA levels of all 3 proteins are downregulated among the MSCs of patients with a positive response to Celyvir.

- ✓ **MAVS** has displayed a medium-high relationship with the *defense response to virus* process too and is also a known effector of this process.

In addition, protein **RANBPC9** has displayed a medium-high relationship with the *regulation of defense response to virus*, despite **not being listed as an effector**. mRNA levels of RANBPC9 are downregulated among responders' cohort.

- 28 additional proteins have shown a medium relationship with the *defense response to virus* and/or the *regulation of defense response to virus* processes, none of them being an effector of these processes.

TABLE 8. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH DEFENSE RESPONSE TO VIRUS SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
------------	-----------	--------------------------------	----------	-----------	-----------------

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP / ↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q7Z434	MAVS	↓	✓	90,73	regulation of defense response to virus
			✓	77,38	defense response to virus
Q13114	TRAF3	↓	✓	84,19	regulation of defense response to virus
Q15366	PCBP2	↓	✓	82,50	regulation of defense response to virus
			✓	81,04	defense response to virus
Q96S59	RANBP9	↑	✗	74,23	regulation of defense response to virus

4.1.2 VIRUS SENSING PRR SIGNALLING

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 112 proteins (88,2%) display a low or no relationship with the general **process** of *virus sensing PRR signalling*. The remaining 15 proteins (11,8%) are somehow related to this process:

- Two proteins are predicted to have a strong relationship with *virus sensing PRR signalling* (Table 9):
 - ✓ No proteins have displayed a very high or high relationship with the process.
 - ✓ **LCN1** and **NGFR** have achieved a medium-high relationship with *virus sensing PRR signalling*, as a whole, despite **not being listed as effectors**. Both proteins are upregulated in the secretome of patients with a positive response to Celyvir.
- The remaining 13 proteins have shown a medium relationship with the *virus sensing PRR signalling general process* processes. Among these are the fibrinogen subunits FGG and FGA, which are listed as effectors of this process in GO [1, 2].

Considering the **subprocesses** included in the *virus sensing PRR signalling* motive individually, some other proteins have been highlighted:

- As shown in Table 9, **TNFRSF8**, **GMNN** and the fibrinogen subunits **FGA**, **FGB** and **FGG** have displayed a high relationship with the *toll-like receptor signaling pathway*. 9 more proteins, **IL24**, **TNFSF12**, **MBL2**, **TNFSF14**, **NF1**, **SRMS**, **TNFRSF14**, **PDGFA** and **FRK** have shown a medium-high relationship.
- No proteins have achieved a strong relationship with *cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway in response to virus or regulation of toll-like receptor signaling pathway*.

TABLE 9. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL SENSING PRR SIGNALLING AND RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/ → = FOUND IN RESPONDERS ONLY). THE LAST COLUMN “SECRETED” INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/ → = responders only)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P31025	LCN1	↑	✗	74,69	Virus sensing PRR signalling	✓
P08138	NGFR	↑	✗	74,61	Virus sensing PRR signalling	✓
P02671	FGA	↑	✓	90,13	toll-like receptor signaling pathway	✓
P02679	FGG	↑	✓	85,20	toll-like receptor signaling pathway	✓
P02675	FGB	↑	✓	81,03	toll-like receptor signaling pathway	✓
P28908	TNFRSF8	↑	✗	79,63	toll-like receptor signaling pathway	✓
O75496	GMNN	↑	✗	78,07	toll-like receptor signaling pathway	✗
Q13007	IL24	↓	✗	77,39	toll-like receptor signaling pathway	✓
O43508	TNFSF12	↓	✗	75,88	toll-like receptor signaling pathway	✓
P11226	MBL2	↓	✗	75,53	toll-like receptor signaling pathway	✓
O43557	TNFSF14	↓	✗	75,42	toll-like receptor signaling pathway	✓
P21359	NF1	↓	✗	74,96	toll-like receptor signaling pathway	✓
Q9H3Y6	SRMS	→	✗	74,92	toll-like receptor signaling pathway	✗
Q92956	TNFRSF14	↓	✗	74,42	toll-like receptor signaling pathway	✗
P04085	PDGFA	↓	✗	74,25	toll-like receptor signaling pathway	✓
P42685	FRK	↑	✗	74,15	toll-like receptor signaling pathway	✓

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 98 proteins (97%) display a low or no relationship with the general **process** of *virus sensing PRR signalling*. The remaining 3 proteins are somehow related to this process:

- One protein is predicted to have a strong relationship with *virus sensing PRR signaling* (Table 10):
 - ✓ No transcriptome proteins have displayed a very high or high relationship with the *viral sensing PRR signalling* process, as a whole.
 - ✓ **TRAF3** has displayed a medium-high relationship with this general process and is also a listed effector. The mRNA levels of this protein are downregulated among the MSCs of patients with a positive response to Celyvir.
- 2 more proteins (MAVS and DEK) have obtained a medium relationship score with *viral sensing PRR signalling*, as a whole, despite not being listed effectors of this process.

Taking into account the **subprocesses** included in the *virus sensing PRR signalling* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 10):

- **TRAF3** and **FASN** have displayed a high relationship with the *toll-like receptor signaling pathway*. Also, DEK and ZNRD1 have shown a medium-high relationship.
- **TRAF3** has also displayed a medium-high relationship with the *regulation of toll-like receptor signaling pathway*.
- No proteins have achieved a strong relationship with *cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway in response to virus*.

TABLE 10. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL SENSING PRR SIGNALLING AND RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q13114	TRAF3	↓	✓	74,32	Virus sensing PRR signalling
			✓	84,18	toll-like receptor signaling pathway
			✗	75,06	regulation of toll-like receptor signaling pathway
P49327	FASN	↓	✗	78,50	toll-like receptor signaling pathway
P35659	DEK	↑	✗	77,88	toll-like receptor signaling pathway
Q9P1U0	ZNRD1	↓	✗	74,60	toll-like receptor signaling pathway

4.1.3 INTERFERON RESPONSE

This process has been further divided in IFN type I response and IFN gamma response.

SECRETOME

IFN TYPE I RESPONSE

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 68 proteins (53,5%) display a low or no relationship with the general **process** of *IFN type I response*. The remaining 59 proteins (46,5%) are somehow related to this process:

- 9 proteins are predicted to have a strong relationship with the *IFN type I response*:
 - ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with this process.
 - ✓ As shown in Table 11, the metalloproteinase **MMP12** has shown a high relationship with the *IFN type I response*, as a whole. In fact, this protein is listed as one of the effectors of this process. MMP12 is downregulated in the secretome of MSCs of patients with a positive response to Celyvir.
 - ✓ As shown in Table 11, **TGFBR2**, **TNFRSF14**, **NF1**, **GRN**, **FASLG**, **FGA**, **FGB** and **FGG** have achieved a medium-high relationship with the *IFN type I response* general

process. **None of these proteins are listed as effectors** of this process. The fibrinogen subunits FGA, FGB and FGG are upregulated in the responders' cohort, while the remaining proteins are downregulated in that same cohort.

- The remaining 50 proteins have shown a medium relationship with the *IFN type I response* general process. Among these, a known effector of the process, IL-10 can be found.

Considering the **subprocesses** included in the *IFN type I response* process individually several other proteins have been highlighted:

- As shown in Table 11, **MMP12**, **CXCR4** and **NF1** have displays a high relationship with the *regulation of type I interferon production*. A medium-high relationship has been shown by **FGA**, **TNFRSF8** and **TNFSF12**.
- As shown in Table 11, **CER1** has achieved a high relationship with the *regulation of type I interferon-mediated signaling pathway*. **MMP12**, **THPO** and **GRB2** display a medium-high relationship.
- No proteins have achieved a strong relationship with *type I interferon production or response to type I interferon* process.

TABLE 11. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IFN TYPE I RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P39900	MMP12	↓	✓	91,48	IFN type I response	✓
			✓	90,65	regulation of type I interferon production	
			✓	77,02	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	
P37173	TGFBR2	↓	✗	76,58	IFN type I response	✓
P02671	FGA	↑	✗	76,54	IFN type I response	✓
			✗	74,92	regulation of type I interferon production	
P21359	NF1	↓	✗	75,66	IFN type I response	✓
			✗	78,14	regulation of type I interferon production	
Q92956	TNFRSF14	↓	✗	75,55	IFN type I response	✗
P02679	FGG	↑	✗	75,30	IFN type I response	✓
P02675	FGB	↑	✗	74,93	IFN type I response	✓
P28799	GRN	↓	✗	74,23	IFN type I response	✓
P48023	FASLG	↓	✗	74,04	IFN type I response	✓
P61073	CXCR4	↓	✗	78,42	regulation of type I interferon production	✓
P28908	TNFRSF8	↑	✗	74,61	regulation of type I interferon production	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O43508	TNFSF12	↓	×	74,05	regulation of type I interferon production	✓
O95813	CER1	↓	×	78,50	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	✓
P40225	THPO	↓	×	75,16	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	✓
P62993	GRB2	↑	×	74,82	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	✓

IFN GAMMA RESPONSE

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 65 proteins (51,2%) display a low or no relationship with the general **process** of *IFN gamma response*. The remaining 62 proteins (48,8%) are somehow related to this process:

- Six proteins are predicted to have a strong relationship with the *IFN gamma response* (Table 12):
 - ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with this general process.
 - ✓ **CCL11** and **FGA** have shown a high relationship with the *IFN gamma response*, as a whole. In fact, **only CCL11 is listed as effector of this process**. FGA is upregulated in the secretome of MSCs of patients with a positive response to Celyvir, while CCL11 is downregulated in that same cohort.
 - ✓ 4 additional proteins, **CCL2**, **FGB**, **IL6R** and **TGFBR2** have achieved a medium-high relationship with the *IFN gamma response* general process. Of these, **only CCL2 is listed as effector of this process**. CCL2 and FGB are upregulated in the responders' cohort, while IL6R and TGFBR2 are downregulated in that same cohort.
- The remaining 56 proteins have shown a medium relationship with the general *IFN gamma response* process. Among these is listed ICAM-1, an effector of this process.

Considering the **subprocesses** included in the *IFN gamma response* motive individually several other proteins have been highlighted (described in Table 12):

- **CCL11**, **CCL2** and **TGFBR2** have displayed a high relationship with the *response to interferon-gamma*. **GMNN**, **IL6R** and **FGA** have shown a medium-high relationship.
- No proteins have achieved a strong relationship with *interferon-gamma production*, *interferon-gamma secretion* or *regulation of response to interferon-gamma*.

TABLE 12. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IFN-GAMMA RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P51671	CCL11	↓	✓	78,83	IFN gamma response	✓
			✓	84,21	response to interferon-gamma	
P02671	FGA	↑	✗	78,31	IFN gamma response	✓
			✗	74,70	response to interferon-gamma	
P13500	CCL2	↑	✓	76,45	IFN gamma response	✓
			✓	79,49	response to interferon-gamma	
P02675	FGB	↑	✗	76,26	IFN gamma response	✓
P08887	IL6R	↓	✗	75,65	IFN gamma response	✓
			✗	75,22	response to interferon-gamma	
P37173	TGFB2	↓	✗	74,46	IFN gamma response	✓
			✗	78,67	response to interferon-gamma	
O75496	GMNN	↑	✗	77,43	response to interferon-gamma	✗

TRANSCRIPTOME

IFN TYPE I RESPONSE

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 77 proteins (76,2%) display a low or no relationship with the general **process** of *IFN type I response*. The remaining 24 proteins (23,8%) are related to this process:

TABLE 13. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IFN TYPE I RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q15366	PCBP2	↓	✓	82,13	IFN type I response
			✓	82,46	regulation of IFN type I production
Q92597	NDRG1	↓	✗	77,28	IFN type I response
Q9HCK5	AGO4	↑	✗	75,73	IFN type I response
Q13114	TRAF3	↓	✓	74,46	IFN type I response
			✓	79,08	regulation of IFN type I production
Q12834	CDC20	↓	✗	74,36	IFN type I response
Q72434	MAVS	↓	✓	77,67	regulation of IFN type I production
			✓	88,63	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
P49327	FASN	↓	✗	77,39	regulation of IFN type I production
Q9ULM6	CNOT6	↑	✗	78,72	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
P00533	EGFR	↑	✗	74,59	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway

- Five proteins are predicted to have a strong relationship with the *IFN type I response* (Table 13):

- ✓ No transcriptome proteins have displayed a very high relationship with the *IFN type I response*, as a whole.
- ✓ One protein, **PCBP2** has achieved a high relationship score with this general process and is also a listed effector. The mRNA levels of this protein are downregulated among the MSCs of patients with a positive response to Celyvir.

Additionally, 4 more proteins **NDRG1**, **AGO4**, **TRAF3** and **CDC20** have shown a medium-high relationship with the *IFN type I response* general process. Of these, **only protein TRAF3 is described as an effector** of this process. The mRNA levels of NDRG1, TRAF3 and CDC20 are upregulated among the MSCs of patients with a positive response to Celyvir, while AGO4 is downregulated in that same cohort.

- 19 more proteins have obtained a medium relationship score with *IFN type I response*, as a whole. Of these, protein MAVS is listed effector of this process.

Taking into account the **subprocesses** included in the *IFN type I response* motive individually several proteins have been highlighted (described in Table 13):

- **PCBP2** and **TRAF2** have displayed a high relationship with the *regulation of type I interferon production*. **MAVS** and **FASN** have shown a medium-high relationship with the *regulation of type I interferon production*.
- **MAVS** and **CNOT6** have achieved a high relationship with the *regulation of type I interferon-mediated signaling pathway*. An additional protein, **EGFR** has displayed a medium-high relationship.
- No proteins have achieved a strong relationship with *type I interferon production or response to type I interferon*.

IFN GAMMA RESPONSE

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 68 proteins (67,3%) display a low or no relationship with the general process of *IFN gamma response*. The remaining 33 proteins (32,7%) are somehow related to this process:

- Two proteins are predicted to have a strong relationship with the *IFN gamma response* (Table 14):
- ✓ No proteins have displayed a very high or high relationship with this general process.
- ✓ **EIF4E** and **ZNRD1** have shown a medium-high relationship with the *IFN gamma response*, as a whole, despite **not being listed as effectors of this process**. mRNA

levels of both proteins are downregulated in MSCs of patients with a positive response to Celyvir.

- The remaining 31 proteins have shown a medium relationship with the *IFN gamma response* general process, with no described effector among them.

Considering the **subprocesses** included in the *IFN gamma response* motive individually several proteins have been highlighted (Table 14):

- Proteins **LRRC39** and **FASN** have displayed a medium-high relationship with the *response to interferon-gamma* specific process.
- No protein has achieved a strong relationship with *interferon-gamma production*, *interferon-gamma secretion* or *regulation of response to interferon-gamma*.

TABLE 14. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IFN GAMMA RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
P06730	EIF4E	↓	✗	75,98	IFN gamma response
Q9P1U0	ZNRD1	↓	✗	74,12	IFN gamma response
Q96DD0	LRRC39	↑	✗	74,30	response to interferon-gamma
P49327	FASN	↓	✗	74,14	response to interferon-gamma

4.1.4 REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE

SECRETOME

The **process** of *regulation of innate immune response* has displayed a low or no relationship with 40 proteins (31,5%) of the 127 differential proteins detected in the secretome analysis. The remaining 87 proteins (68,5%) are somehow related to the process:

- Four proteins are predicted to have a strong relationship with the regulation of innate immune response (Table 15):
 - ✓ No protein has achieved a very high relationship with this process.
 - ✓ **POMC** and **IL36B** have displayed a high relationship with the *regulation of innate immune response*, as a whole, process for which both are described effectors. Of note, both these proteins are downregulated in the secretome of patients with a positive response to Celyvir.
 - ✓ **IL17B** and **IL22RA2** have shown a medium-high relationship with this process. Both proteins are listed as effectors of the *regulation of innate immune response*. IL17B and IL22RA2 are downregulated in the responders' cohort.

- 83 additional proteins have reached a medium relationship with the general process of *regulation of innate immune response*. Of note, 22 known protein effectors (26,5%) of this motive are included among them.

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of innate immune response* motive several proteins have been highlighted (described in Table 15):

- IL22RA2**, **IL17B** and **CPN2** have achieved a high relationship with the *regulation of inflammatory response*.
- CPN2** has achieved a high relationship with the *regulation of complement activation*.
- PMOC** and **IL36B** have displayed a high relationship with the *regulation of cytokine production*; and **IL17B**, **IL1RN** and **MMP12** have achieved a medium-high relationship.
- IL10**, **IL6**, **IL6R**, **AGER** and **CNTF** have displayed a high relationship with the *regulation of chemokine production*. In addition, **FGB**, **IL4**, **TNFRSF14** and **EPO** have shown a medium-high relationship.
- CARTPT** has displayed a high relationship with *regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity*.

TABLE 15. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q9NZH7	IL36B	↓	✓	78,37	regulation of innate immune response	✓
			✓	80,64	regulation of cytokine production	
P01189	POMC	↓	✓	78,51	regulation of innate immune response	✓
			✓	85,05	regulation of cytokine production	
Q9UHF5	IL17B	↓	✓	76,55	regulation of innate immune response	✓
			✓	79,18	regulation of inflammatory response	
			✓	77,95	regulation of cytokine production	
Q969J5	IL22RA2	↓	✓	75,75	regulation of innate immune response	✓
			✓	85,63	regulation of inflammatory response	
P22792	CPN2	↓	✓	78,67	regulation of inflammatory response	✓
			✓	86,29	regulation of complement activation	
P18510	IL1RN	↓	✓	74,35	regulation of cytokine production	✓
P39900	MMP12	↓	✓	74,22	regulation of cytokine production	✓
P22301	IL10	↑	✓	88,98	regulation of chemokine production	✓
P05231	IL6	↑	✓	87,23	regulation of chemokine production	✓
P08887	IL6R	↓	✓	85,67	regulation of chemokine production	✓
Q15109	AGER	↓	✓	85,02	regulation of chemokine production	✓
P26441	CNTF	↑	✗	79,32	regulation of chemokine production	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P02675	FGB	↑	×	75,51	regulation of chemokine production	✓
P05112	IL4	↓	×	75,34	regulation of chemokine production	✓
Q92956	TNFRSF14	↓	×	75,08	regulation of chemokine production	×
P01588	EPO	↑	×	74,34	regulation of chemokine production	✓
Q16568	CARTPT	↓	×	78,23	regulation of natural killer mediated cytotoxicity	✓

TRANSCRIPTOME

The **process** of *regulation of innate immune response* has displayed a low or no relationship with 31 proteins (30,7%) of the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis. The remaining 70 proteins (69,3%) are somehow related to the process:

- No proteins have achieved a strong relationship with the *regulation of innate immune response*, as a whole.
- These 70 proteins have reached a medium relationship with the general process of *regulation of innate immune response*. Of note, 8 known protein effectors (11,4%) of this motive are included among them (XBP1, BLMN, MUC12, CLEC5A, PCBP2, MAVS, TRAF3 and EGFR).

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of innate immune response* motive individually several proteins have been highlighted (described in Table 16):

- **INADL** has achieved a high relationship with the *regulation of inflammatory response*.
- **MAVS** has achieved a very high relationship with the process of *regulation of chemokine production* and **SLC39A8** a medium-high relationship.
- No proteins have achieved a strong relationship with *regulation of complement activation*, the *regulation of cytokine production* or the *regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity* subprocesses.

TABLE 16. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A VERY HIGH, HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q8NI35	INADL	↓	×	74,54	regulation of inflammatory response
Q7Z434	MAVS	↓	✓	92,29	regulation of chemokine production
Q9C0K1	SLC39A8	↑	×	75,76	regulation of chemokine production

4.1.5 RNA-INTERFERENCE

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 120 proteins (94,5%) display a low or no relationship with RNA interference. The remaining 7 proteins (5,5%) are somehow related to this process :

- No secretome proteins have displayed a strong relationship with this process.
- These 7 proteins (TNFRSF14, CRP, PDGFB, ICAM1, SFRP4, GH1 and PPBP) have shown a medium relationship with *RNA interference*. None of them are effector proteins of this process.

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 89 proteins (88,1%) display a low or no relationship with RNA interference. The remaining 12 proteins (11,9%) are somehow related to this process:

- Two proteins are predicted to have a strong relationship with RNA interference (Table 17):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with the *RNA interference* process.
 - ✓ One protein, **AGO4** have displayed a high relationship with the *RNA interference* process. AGO4 is a described effector of this process and its mRNA levels are upregulated among the responders' cohort.
 - ✓ **MEMO1** has shown a medium-high relationship with the studied process, despite **not being listed as an effector** of this process. mRNA levels of this protein are downregulated in MSCs of patients with a positive response to Celyvir.
- 10 proteins have shown a medium relationship with the *RNA interference* mechanisms. None are effector proteins of this process.

TABLE 17. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH RNA INTERFERENCE MECHANISMS. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP / ↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP / ↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q9HCK5	AGO4	↑	✓	79,49	RNA interference
Q9Y316	MEMO1	↓	✗	74,24	RNA interference

4.1.6 ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 93 proteins (73,2%) display a low or no relationship with antigen processing and presentation, as described in GO database [1, 2]. The remaining 34 proteins (26,7%) are related somehow to this process:

- Three proteins are predicted to have a strong relationship with antigen processing and presentation (Table 18):
 - ✓ No proteins have displayed a very high or high relationship with this process.
 - ✓ 3 proteins, **SFRP4**, **TGFBR2** and **LTBP1**, have reached a medium-high relationship with the *antigen processing and presentation* process. SFRP4 and TGFBR2 are downregulated among responders, while LTBP1 is downregulated in that same cohort. None of them are listed as effector proteins of this process.
- 31 proteins have shown a medium relationship with the studied process, among which is listed ICAM1, an effector protein of this process.

TABLE 18. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION MECHANISMS. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SIGN OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q6FHJ7	SFRP4	↓	✗	77,63	Antigen processing and presentation
P37173	TGFBR2	↓	✗	77,12	Antigen processing and presentation
Q14766	LTBP1	↑	✗	74,11	Antigen processing and presentation

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 83 proteins (82,2%) display a low or no relationship with antigen processing and presentation mechanisms. The remaining 18 proteins (17,8%) are related to this process:

- No transcriptome protein has displayed a strong relationship with the studied process.
- The remaining 31 proteins have shown a medium relationship with the *antigen processing and presentation* process, among which a known effector of the process (KIF2A) is listed.

4.1.7 REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE

SECRETOME

The **process** of *regulation of adaptive immune response* has displayed a low or no relationship with 68 proteins (53,5%) of the 127 differential proteins detected in the secretome analysis. The remaining 59 proteins (46,5%) are somehow related to the process:

- Ten proteins are predicted to have a strong relationship with the *regulation of adaptive immune response* (Table 19):
 - ✓ No proteins have achieved a very high relationship with this process.
 - ✓ **IL6R** and **AGER** have displayed a high relationship with the *regulation of adaptive immune response*, as a whole. Both are described effectors of this process. Of note, both proteins are downregulated in the secretome of patients with a positive response to Celyvir.
 - ✓ 8 more proteins, **FGA**, **NF1**, **IL10**, **IL4**, **IL2**, **IL6**, **FGG** and **TGFBR2** have shown a medium-high relationship with this process, among which **only the interleukins** (IL2, IL4, IL6 and IL10) **are listed as effector proteins**. FGA, IL10, IL2, IL6 and FGG are upregulated in the responders' cohort, while IL4, NF1 and TGFBR2 are downregulated.
- 49 additional proteins have reached a medium relationship with the general process of *regulation of adaptive immune response*. Of note, none are described effector proteins.

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of adaptive immune response* general motive, several proteins have been highlighted (described in Table 19):

- **IL6**, **IL24**, **GH1** and **AGER** have achieved a high relationship with the *regulation of T cell mediated immunity*. In addition, **IL10**, **IL4**, **EPO**, **CSF3**, **THPO** and **PRL** have shown medium-high relationship.
- **AGER** has achieved a very-high relationship with the *regulation of T cell mediated cytotoxicity*. **IL6**, **GH1** and **CARTPT** have achieved a high relationship and **IL24** has displayed a medium-high relationship.
- **IL6R** has achieved a high relationship with the *regulation of T-helper 1 type immune response*. Also, **THPO**, **IL22RA2**, **CNTF**, **IL10** and **IL24** have shown medium-high relationship.
- **IL4**, **IL2** and **IL10** display a high relationship with *regulation of B cell mediated immunity*.
- The *regulation of immunoglobulin mediated immune response*, has displayed a high relationship with **IL2**, **IL4**, **IL6** and **IL10**; and a medium-high relationship with **NGFR** and **TNFRSF11A**.

TABLE 19. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN “SECRETED” INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q15109	AGER	↓	✓	83,18	regulation of adaptive immune response	✓
			✓	84,34	regulation of T cell mediated immunity	
			✓	92,67	regulation of T cell mediated cytotoxicity	
P08887	IL6R	↓	✓	81,76	regulation of adaptive immune response	✓
			✓	90,5	regulation of T-helper 1 type immune response	
P02671	FGA	↑	✗	75,72	regulation of adaptive immune response	✓
P21359	NF1	↓	✗	75,42	regulation of adaptive immune response	✓
P22301	IL10	↑	✓	75,37	regulation of adaptive immune response	✓
			✗	77,88	regulation of T cell mediated immunity	
			✗	75,27	regulation of T-helper 1 type immune response	
			✓	82,03	regulation of B cell mediated immunity	
			✓	89,46	regulation of immunoglobulin mediated immune response	
P05112	IL4	↓	✓	75,03	regulation of adaptive immune response	✓
			✗	77,25	regulation of T cell mediated immunity	
			✓	83,84	regulation of B cell mediated immunity	
			✓	90,72	regulation of immunoglobulin mediated immune response	
P60568	IL2	↑	✓	74,86	regulation of adaptive immune response	✓
			✓	83,76	regulation of B cell mediated immunity	
			✓	86,58	regulation of immunoglobulin mediated immune response	
P05231	IL6	↑	✓	74,62	regulation of adaptive immune response	✓
			✓	80,55	regulation of T cell mediated immunity	
			✗	78,9	regulation of T cell mediated cytotoxicity	
			✓	80,15	regulation of immunoglobulin mediated immune response	
P02679	FGG	↑	✗	74,52	regulation of adaptive immune response	✓
P37173	TGFBR2	↓	✗	74,22	regulation of adaptive immune response	✓
Q13007	IL24	↓	✗	81,94	regulation of T cell mediated immunity	✓
			✗	76,12	regulation of T cell mediated cytotoxicity	
			✗	75,14	regulation of T-helper 1 type immune response	
P01241	GH1	↓	✗	79,67	regulation of T cell mediated immunity	✓
			✗	78,6	regulation of T cell mediated cytotoxicity	
P01588	EPO	↑	✗	77,25	regulation of T cell mediated immunity	✓
P09919	CSF3	↑	✗	76,71	regulation of T cell mediated immunity	✓
P40225	THPO	↓	✗	76,65	regulation of T cell mediated immunity	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑= UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
			✗	75,56	regulation of T-helper 1 type immune response	
P01236	PRL	↓	✗	74,3	regulation of T cell mediated immunity	✓
Q16568	CARTPT	↓	✗	80,87	regulation of T cell mediated cytotoxicity	✓
Q969J5	IL22RA2	↓	✗	75,41	regulation of T-helper 1 type immune response	✓
P26441	CNTF	↑	✗	75,27	regulation of T-helper 1 type immune response	✓
Q9Y6Q6	TNFRSF11A	↑	✗	76,52	regulation of immunoglobulin mediated immune response	✗
P08138	NGFR	↑	✗	74,56	regulation of immunoglobulin mediated immune response	✓

TRANSCRIPTOME

The general **process** of *regulation of innate immune response* has displayed a low or no relationship with 77 proteins (76,2%) of the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis. The remaining 24 proteins (23,8%) are somehow related to the process:

- Two proteins are predicted to have a strong relationship with regulation of innate immune response (Table 20):
 - ✓ No proteins have achieved a very-high relationship with the *regulation of adaptive immune response*.
 - ✓ **NDRG1** has reached a high relationship with this process and its mRNA is downregulated within the transcriptome of patients with a positive response to Celyvir. Of note, NDRG1 is **not listed as an effector protein** of this process.
 - ✓ **STIP1** has shown medium-high relationship with the process, despite **not being an effector protein**. Its mRNA is upregulated among responders.
- The remaining 22 proteins have reached a medium relationship with the general process of *regulation of adaptive immune response*, among which there is only one protein described as effector (XBP1).

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of adaptive immune response* motive individually several proteins have been highlighted (Table 20):

- **VPS16** has achieved a medium-high relationship with the process of *regulation of chemokine production*.
- **SLC39A8** and **XBP1** have shown a high relationship with the *regulation of immunoglobulin mediated immune response*.

- No proteins have shown a strong relationship with *regulation of B cell mediated immunity*, *regulation of T cell mediated immunity* or *regulation of T-helper 1 type immune response* processes.

TABLE 20. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q92597	NDRG1	↓	×	78,37	regulation of adaptive immune response
P31948	STIP1	↑	×	75,19	regulation of adaptive immune response
Q9H269	VPS16	↓	×	77,76	regulation of T cell mediated cytotoxicity
P17861	XBP1	↑	✓	81,54	regulation of immunoglobulin mediated immune response
Q9C0K1	SLC39A8	↑	×	80,63	regulation of immunoglobulin mediated immune response

4.1.8 ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 115 proteins (90,5%) display a low or no relationship with the *immune response to tumor cell* and *regulation of immune response to tumor cell* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 12 proteins (9,5%) are somehow related to the one or both of these processes:

- No proteins have displayed a strong relationship with the antitumor immune response.
- 12 proteins have shown a medium relationship with the *immune response to tumor cell* and/or the *regulation of immune response to tumor cell* processes. Of note, no known effector of these processes is found among these proteins.

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 95 proteins (94,1%) display a low or no relationship with both *immune response to tumor cell* and *regulation of immune response to tumor cell* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 6 proteins (5,9%) are somehow related to the one or both of these processes:

- No proteins have displayed a strong relationship with the antitumor immune response.
- The remaining 6 proteins have shown a medium relationship with the *immune response to tumor cell* and/or the *regulation of immune response to tumor cell* processes. Of note, no known effector of these processes is found among them.

4.1.9 REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION

SECRETOME

The general **process** of *regulation of leukocyte differentiation* has displayed a low or no relationship with 45 proteins (35,4%) of the 127 differential proteins detected in the secretome analysis. The remaining 82 proteins (64,6%) are somehow related to the process:

- Four proteins are predicted to have a strong relationship with the regulation of leukocyte differentiation, as a whole (Table 21):
 - ✓ No proteins have achieved a very-high relationship with the *regulation of leukocyte differentiation*.
 - ✓ One protein, **CARTPT**, have reached a high relationship. It is an effector protein of this process and is downregulated within the secretome of responders.
 - ✓ **AGER**, **IL2** and **IL4** have shown a medium-high relationship. All of them are described as effectors of this process. IL4 and AGER are downregulated among the responders, while IL2 is upregulated in that same cohort.
- The remaining 78 proteins have reached a medium relationship with the general process of *regulation of leukocyte differentiation*, among which are 4 effector proteins: NF1, TGFBR2, ADIPOQ and CSF1.

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of leukocyte differentiation* motive several proteins have been highlighted (Table 21):

- **IL2** have achieved a high relationship with the *regulation of T cell differentiation*. 3 proteins, **IL4**, **WFIKKN1** and **WFIKKN2** have shown a medium-high relationship.
- **TNFSF14**, **CSF3**, **TNFSF10**, **PLG** and **CSF1** have reached a medium-high relationship with *leukocyte differentiation*.

TABLE 21. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH REGULATION OF T CELL DIFFERENTIATION SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q16568	CARTPT	↓	✓	91,12	regulation of leukocyte differentiation	✓
P05112	IL4	↓	✓	77,70	regulation of leukocyte differentiation	✓
P60568	IL2	↑	✓	75,88	regulation of leukocyte differentiation	✓
Q15109	AGER	↓	✓	75,43	regulation of leukocyte differentiation	✓
P60568	IL2	↑	✓	80,01	regulation of T cell differentiation	✓
Q96NZ8	WFIKKN1	↓	✗	77,92	regulation of T cell differentiation	✓
Q8TEU8	WFIKKN2	↓	✗	77,11	regulation of T cell differentiation	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑= UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P05112	IL4	↓	✓	76,4	regulation of T cell differentiation	✓
P09603	CSF1	↓	✓	77,82	leukocyte differentiation	✓
P00747	PLG	↓	✗	74,91	leukocyte differentiation	✓
P50591	TNFSF10	↑	✗	74,76	leukocyte differentiation	✓
P09919	CSF3	↑	✓	74,63	leukocyte differentiation	✓
O43557	TNFSF14	↓	✗	74,32	leukocyte differentiation	✓

TRANSCRIPTOME

The general **process** of *regulation of leukocyte differentiation* has displayed a low or no relationship with 58 proteins (57,4%) of the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis. The remaining 43 proteins (42,6%) are somehow related to the process:

- Three proteins are predicted to have a strong relationship with regulation of leukocyte differentiation, as a whole (Table 22):
 - ✓ No proteins have achieved a very-high relationship with the *leukocyte differentiation*.
 - ✓ One protein, **DEK**, has reached a high-relationship with the studied process. Its mRNA levels are upregulated among responders. It is **not listed as effector** of this process.
 - ✓ **STIP1**, **RANBP9** are the two proteins with a medium-high relationship, and are both upregulated in the *leukocyte differentiation* process. Both proteins have upregulated mRNA levels among the cohort of responders. **None are described as effectors**.
- The remaining 40 proteins have shown a medium relationship with the *leukocyte differentiation*, among of which there is one effector protein (XBP1).

Considering the subprocesses included in the *regulation of leukocyte differentiation* motive several proteins have been highlighted (Table 22):

- 3 proteins, **TRAF3**, **XBP1**, and **HHIP** have achieved a medium-high relationship with the *regulation of T cell differentiation*.
- **NDRG1** has reached a medium-high relationship with *leukocyte differentiation*.

TABLE 22. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH THE REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑= UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑= UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
------------	-----------	-------------------------------	----------	-----------	-----------------

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q92597	NDRG1	↓	×	74,30	leukocyte differentiation
P35659	DEK	↑	×	78,83	regulation of leukocyte differentiation
Q96S59	RANBP9	↑	×	76,94	regulation of leukocyte differentiation
P31948	STIP1	↑	×	76,03	regulation of leukocyte differentiation
Q96QV1	HHIP	↓	×	77,28	regulation of T cell differentiation
P17861	XBP1	↑	✓	76,52	regulation of T cell differentiation
Q13114	TRAF3	↓	×	74,15	regulation of T cell differentiation

4.1.10 REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION

This process has been further divided in leukocyte migration and regulation of leukocyte migration.

SECRETOME

LEUKOCYTE MIGRATION

Considering the general **process** of *leukocyte migration*, of the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 48 proteins (37,8%) display a low or no relationship with the process. The remaining 79 proteins (62,2%) are somehow related to this process:

- Six proteins are predicted to have a strong relationship with the *leukocyte migration* process (Table 24):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with *leukocyte migration*.
 - ✓ Two proteins, **IL1RN** and **IL36B** have reached a high relationship with the *leukocyte migration*, both described as effector proteins. Both are downregulated in the responders' cohort.
 - ✓ **ANGPT2**, **SELP**, **TNFRSF10A** and **VASN** have displayed a medium-high relationship with the studied process. Most of them are described as **effectors of this process, with the exception of VASN**. mRNA levels of SELP, VASN and TNFRSF10A are upregulated among the responders, while ANGPT2 levels are downregulated.
- The related 73 proteins have shown a medium relationship with the *leukocyte migration*, among of which there are 36 effector proteins (49,3%).

Considering the **subprocesses** included in the *leukocyte migration* motive, several proteins have been highlighted (Table 23):

- **CCL2** has achieved a very-high relationship with the *cellular extravasation*. **ICAM1**, **ROCK1** and **SELP** have reached a high relationship; and **CCL11** and **FER** have shown a medium-high relationship.

- **IL1RN** has shown a very-high relationship with *leukocyte chemotaxis process*. 11 proteins, **IL10, TGFB2, IL16, IL36B, CXCL10, PPBP, IL6R, CXCR4, CCL11, IL6** and **PDGFB** have shown a high relationship; while **IL17C, THPO, EPO, IBSP** and **CCL2** display a medium-high relationship.

TABLE 23. SECRETOME PROTEINS WITH A VERY-HIGH, HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH LEUKOCYTE MIGRATION PROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (\uparrow = UP/ \downarrow = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (\uparrow = UP/ \downarrow = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P18510	IL1RN	\downarrow	\checkmark	79,96	leukocyte migration	\checkmark
			\checkmark	93,96	leukocyte chemotaxis	
Q9NZH7	IL36B	\downarrow	\checkmark	79,49	leukocyte migration	\checkmark
			\checkmark	84,88	leukocyte chemotaxis	
Q6EMK4	VASN	\uparrow	\times	76,71	leukocyte migration	\checkmark
O00220	TNFRSF10A	\uparrow	\checkmark	76,70	leukocyte migration	\times
P16109	SELP	\uparrow	\checkmark	75,52	leukocyte migration	\checkmark
			\checkmark	91,61	cellular extravasation	
O15123	ANGPT2	\downarrow	\checkmark	75,50	leukocyte migration	\checkmark
P13500	CCL2	\uparrow	\checkmark	93,32	cellular extravasation	\checkmark
			\checkmark	77,45	leukocyte chemotaxis	
Q13464	ROCK1	\uparrow	\checkmark	91,59	cellular extravasation	\checkmark
P05362	ICAM1	\downarrow	\checkmark	88,2	cellular extravasation	\checkmark
P16591	FER	\uparrow	\checkmark	77,82	cellular extravasation	\checkmark
P51671	CCL11	\downarrow	\times	74,5	cellular extravasation	\checkmark
			\checkmark	78,29	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P22301	IL10	\uparrow	\checkmark	91,76	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P61812	TGFB2	\downarrow	\checkmark	90,13	leukocyte chemotaxis	\checkmark
Q14005	IL16	\downarrow	\checkmark	88,14	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P02778	CXCL10	\downarrow	\checkmark	82,21	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P02775	PPBP	\downarrow	\checkmark	81,59	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P08887	IL6R	\downarrow	\checkmark	79,96	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P61073	CXCR4	\downarrow	\checkmark	79,58	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P05231	IL6	\uparrow	\checkmark	78,2	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P01127	PDGFB	\downarrow	\checkmark	78,18	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P21815	IBSP	\uparrow	\times	75,67	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P01588	EPO	\uparrow	\times	74,85	leukocyte chemotaxis	\checkmark
P40225	THPO	\downarrow	\times	74,09	leukocyte chemotaxis	\checkmark
Q9P0M4	IL17C	\downarrow	\times	74,05	leukocyte chemotaxis	\checkmark

REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION

For the general **process** of *regulation of leukocyte migration*, of the 127 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 52 proteins (40,9%) display a low or no relationship with the process. The remaining 75 proteins (59,1%) are somehow related to this process:

- Eleven proteins are predicted to have a strong relationship with the *regulation of leukocyte migration* general process (Table 24):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with the studied process.
 - ✓ **BMP5, THBS4, TNFSF14, VEGFC, SELP, MSTN** and **CXCL10** have reached a high relationship with the studied process, and all of them are its effectors. Proteins BMP5, THBS4, TNFSF14 and CXCL10 are downregulated among the secretome of responders, while VEGFC, SELP, MSTN are upregulated in that cohort.
 - ✓ **IL6R, CCL2, ICAM1** and **SERPINE1** have shown a medium-high relationship, and are described as effectors. SERPINE1 is exclusively detected among responders, while CCL2 is downregulated and IL6R and ICAM1 are upregulated in that same cohort.
- The related 64 proteins have shown a medium relationship with the studied process, with only two of them (TNFSF14 and CSF1) described as effector proteins.

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of leukocyte migration* motive, several proteins have been highlighted (Table 24):

- **IL1RN** and **ICAM1** have reached a high relationship with the *regulation of cellular extravasation*.
- THBS4, VEGFC, MSTN, CXCL10 and CCL2 have reached a high relationship with *regulation of leukocyte chemotaxis*. Also, **FGB, SERPINE1, CSF1, IL6R** and **TNFSF14** have achieved a medium-high relationship.

TABLE 24. SECRETOME PROTEINS WITH A VERY-HIGH, HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH THE REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = ONLY IN RESPONDING INDIVIDUALS).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P22003	BMP5	↓	✓	86,34	regulation of leukocyte migration	✓
P35443	THBS4	↓	✓	85,45	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	87,81	regulation of leukocyte chemotaxis	
O43557	TNFSF14	↓	✓	84,58	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	77,99	regulation of leukocyte chemotaxis	
P49767	VEGFC	↑	✓	84,01	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	84,51	regulation of leukocyte chemotaxis	

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/ → = responders only)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P16109	SELP	↑	✓	83,23	regulation of leukocyte migration	✓
O14793	MSTN	↑	✓	81,37	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	82,59	regulation of leukocyte chemotaxis	
P02778	CXCL10	↓	✓	79,74	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	81,86	regulation of leukocyte chemotaxis	
P05121	SERPINE1	→	✓	76,59	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	74,66	regulation of leukocyte chemotaxis	
P05362	ICAM1	↓	✓	76,15	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	85,99	regulation of cellular extravasation	
P13500	CCL2	↑	✓	76,01	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	80,03	regulation of leukocyte chemotaxis	
P08887	IL6R	↓	✓	75,64	regulation of leukocyte migration	✓
			✓	77,52	regulation of leukocyte chemotaxis	
P18510	IL1RN	↓	✗	84,16	regulation of cellular extravasation	✓
P05231	IL6		✓	78,69	regulation of leukocyte chemotaxis	✓
P09603	CSF1	↓	✓	77,02	regulation of leukocyte chemotaxis	✓
P02675	FGB	↑	✗	74,17	regulation of leukocyte chemotaxis	✓

TRANSCRIPTOME

LEUKOCYTE MIGRATION

Considering the general **process** of *leukocyte migration*, from the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 55 proteins (54,45%) display a low or no relationship with the process. The remaining 46 proteins (45,54%) are somehow related to this process:

- Six proteins are predicted to have a strong relationship with leukocyte migration, as a whole (Table 25):
 - ✓ No proteins have displayed either a very high or high relationship with the process.
 - ✓ **LIN54, CHMP2A, NQO1, CLDN2, SUGP1** and **TNKS2** have reached a medium-high relationship with the studied process, **none of them described as effectors**. LIN54, CHMP2A and SUGP1 have upregulated mRNA levels among the responders, while NQO1, SUGP1 and TNKS2 have downregulated levels.
- The related 40 proteins have shown a medium relationship with the *leukocyte migration*, among which one effector protein (PECAM1) is listed.

Considering the **subprocesses** included in the *leukocyte migration* motive, several proteins have been highlighted (described in Table 25):

- **PECAM1** and **VASP** have achieved a very-high relationship with *cellular extravasation*.

- No proteins have shown a strong relationship with *leukocyte chemotaxis*.

REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION

Considering the general **process** of *regulation of leukocyte migration*, from the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 88 proteins (87,1%) display a low or no relationship with the process. The remaining 13 proteins (12,9%) are somehow related to this process:

- No transcriptome proteins have displayed either a strong relationship with *regulation of leukocyte migration*.
- The related 13 proteins have shown a medium relationship with the studied process, none of them described as effector protein.

Considering the **subprocesses** included in the *regulation of leukocyte migration* motive individually:

- No proteins have achieved a strong relationship with *regulation of cellular extravasation* or *regulation of leukocyte chemotaxis*.

TABLE 25. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH RELATIONSHIP WITH THE REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION ASSOCIATED SUBSUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process
Q6MZP7	LIN54	↑	×	75,04	leukocyte migration
O43633	CHMP2A	↑	×	74,74	leukocyte migration
P15559	NQO1	↓	×	74,42	leukocyte migration
P57739	CLDN2	↓	×	74,38	leukocyte migration
Q8IWZ8	SUGP1	↑	×	74,36	leukocyte migration
Q9H2K2	TNKS2	↓	×	74,10	leukocyte migration
P16284	PECAM1	↓	✓	91,66	cellular extravasation
P50552	VASP	↓	×	84,12	cellular extravasation

4.2 RELATIONSHIP WITH VIRAL REPLICATION

The possible relationship between the secretome and transcriptome data and 9 different cellular and molecular processes included in the viral replication and associated GO-based subprocesses [1, 2], have been assessed (details on the identification and selection of each process and subprocess is detailed in the *Methodology* document, and the “Characterization_proposal” Word file and “Characterization_proposal_proteins” Excel file [delivered the 19th October 2018]).

Each process of viral replication has been evaluated in detail in the following sections.

Note: The complete list of results for this evaluation can be found in the “Secretome” and “Transcriptome” sheets, respectively, of the “ANNResults_ViralReplication” Excel file.

Annex 1 contains a legend to facilitate interpretation.

4.2.1 VIRAL LIFE CYCLE

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 70 proteins (55,1%) display a low or no relationship with the *viral life cycle* and *regulation of viral life cycle* processes. The remaining 57 proteins (44,9%) are somehow related to one or both of these processes:

- Seven proteins are predicted to have a strong relationship with the viral life cycle motive (Table 26):

- ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with the processes.
- ✓ One protein, **CLL2** (MCP-1) has displayed a high relationship with the *viral life cycle* and is listed as one of its effector proteins. This secreted protein is found significantly upregulated among the responders.

No proteins have displayed a high relationship with the *regulation of viral life cycle*.

- ✓ **NF1**, **FGB**, **GMNN**, **DLK1** and **VEGFC** have achieved a medium-high relationship score with the *viral life cycle*, although **not being listed as its effectors**. Among these, FGB, GMNN and VEGFC are upregulated in the responders’ cohort, while NF1 and DLK1 are downregulated in the same cohort.

One protein, **GH1**, has achieved a medium-high relationship but is **not an effector** of the *regulation of viral life cycle*. This protein is downregulated among the patients showing a positive response to Celyvir.

- The remaining 50 proteins have shown a medium relationship with the *viral life cycle* and/or the *regulation of viral life cycle* processes. 4 of these proteins are known effectors of these processes.

TABLE 26. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL LIFE CYCLE SUBPROCESSES.
THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN “SECRETED” INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P13500	CCL2	↑	✓	84,41	viral life cycle	✓

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P21359	NF1	↓	×	77,28	viral life cycle	✓
P02675	FGB	↑	×	75,76	viral life cycle	×
O75496	GMNN	↑	×	75,35	viral life cycle	×
P80370	DLK1	↓	×	74,55	viral life cycle	×
P49767	VEGFC	↑	×	74,52	viral life cycle	×
P01241	GH1	↓	×	75,13	regulation of viral life cycle	×

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 56 proteins (55,5%) display a low or no relationship with both *viral life cycle* and *regulation of viral life cycle* processes. The remaining 45 proteins (44,5%) are somehow related to one or both of these processes:

- Seven proteins are predicted to have a strong relationship with the viral life cycle motive (Table 27):

- ✓ No transcriptome protein has displayed a very high relationship with these processes.
- ✓ **CLEC5** and **RAB29** have shown a high relationship with the *viral life cycle* and are listed as effector proteins of the process. Of note, CLEC5 mRNA levels are upregulated among the responders' cohort and RAB29 mRNA levels are downregulated.

Also, **MAVS** has displayed a high relationship with *regulation of viral life cycle*, a process for which the protein is listed as an effector. Its mRNA levels are downregulated among the responders' cohort.

- ✓ **BMPR1B**, **CHMP2A**, **NDUFV2** and **XBP1** have displayed a medium-high relationship with the *viral life cycle*. Only **BMPR1B** and **XBP1** are **not known effectors** of this process. mRNA levels of BMPR1B, CHMP2A and XBP1 are upregulated among responders' cohort, while NDUFV2 mRNA levels are downregulated.

CHMP2A has displayed a medium-high relationship with *regulation of viral life cycle*. Of note, it is listed as an effector of this process.

- 37 additional proteins have shown a medium relationship with the *viral life cycle* and/or the *regulation of viral life cycle* processes. Five of these proteins are known effectors of these processes, as described in GO.

TABLE 27. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL LIFE CYCLE SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SIGN OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q9NY25	CLEC5A	↑	✓	80,38	viral life cycle	✓
O14966	RAB29	↓	✓	80,00	viral life cycle	✓
O00238	BMPR1B	↑	✗	75,93	viral life cycle	✗
O43633	CHMP2A	↑	✓	75,01	viral life cycle	✓
			✓	77,50	regulation of viral life cycle	
P19404	NDUFV2	↓	✓	74,55	viral life cycle	✗
P17861	XBP1	↑	✗	74,49	viral life cycle	✗
Q7Z434	MAVS	↓	✓	82,30	regulation of viral life cycle	✓

4.2.2 VIRAL ENTRY INTO HOST CELL

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 90 proteins (70,8%) display a low or no relationship with the general **process** of *viral entry into host cell*. The remaining 37 proteins (29,1%) are somehow related to this process:

- Five proteins are predicted to have a strong relationship with the viral entry into host cell, as a whole (Table 28):
 - ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with the process.
 - ✓ **CXCR4** and **NGFR** have achieved a high relationship with *viral entry into host cell*. **Only CXCR4 is listed as effector** of this process. NGFR is upregulated in the secretome of patients with a positive response to Celyvir, while CXCR4 is downregulated.
 - ✓ **PDGFA**, **LTBP1** and **PDGFB** have displayed a medium-high relationship with *viral entry into host cell*, as a whole, despite **not being listed as effectors** of this process. PDGFA and PDGFB are downregulated in the secretome of the responders' cohort; LTBP1 is upregulated in these patients.
- The remaining 32 proteins have shown a medium relationship with the *viral entry into host cell* processes. ICAM1 and TNFRSF14 are listed as effectors of this process.

Considering the **subprocesses** included in the *viral entry into host cell* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 28):

- **ICAM1** has displayed a high relationship with *virion attachment to host cell*.

TABLE 28. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH THE VIRAL ENTRY INTO HOST CELL AND RELATED SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑= UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P61073	CXCR4	↓	✓	85,79	viral entry into host cell	✓
P08138	NGFR	↑	✗	79,56	viral entry into host cell	✓
P04085	PDGFA	↓	✗	75,05	viral entry into host cell	✓
Q14766	LTBP1	↑	✗	75,04	viral entry into host cell	✓
P01127	PDGFB	↓	✗	74,23	viral entry into host cell	✓
P05362	ICAM1	↓	✓	78,35	virion attachment to host cell	✓

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 79 proteins (78,2%) display a low or no relationship with the general **process** of *viral entry into host cell*. The remaining 22 (21,8%) proteins are somehow related to this process:

- Four proteins are predicted to have a strong relationship with the *viral entry into host cell* (Table 29):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with the *viral entry into host cell* process, as a whole.
 - ✓ **CLEC5A** and **EFNA5** have displayed a high relationship with this general process. **EFNA5 is not a listed effector**. mRNA levels are downregulated for EFNA5 and upregulated for CLEC5A among the MSCs of responders.
 - ✓ 2 more proteins, **TRAF3** and **EGFR**, have obtained a medium-high relationship score with *viral entry into host cell* and **TRAF3 is not listed as effector** of this process. The mRNA levels of TRAF3 are downregulated and the mRNA levels of EGFR are upregulated among the responders cohort.
- 18 additional proteins have displayed a medium relationship with the process, with no effector protein listed among them.

Taking into account the **subprocesses** included in the *viral entry into host cell* motive individually, another protein has been highlighted (Table 29):

- ✓ No protein has achieved a strong relationship with *virion attachment to host cell*.

TABLE 29. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP THE VIRAL ENTRY INTO HOST CELL AND RELATED SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑= UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑= UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q9NY25	CLEC5A	↑	✓	85,74	viral entry into host cell	✗
P52803	EFNA5	↓	✗	78,39	viral entry into host cell	✗

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP / ↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q13114	TRAF3	↓	✗	77,06	viral entry into host cell	✗
P00533	EGFR	↑	✓	74,44	viral entry into host cell	✗

4.2.3 INTRACELLULAR TRANSPORT OF VIRUS

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 86 proteins (67,7%) display a low or no relationship with the *intracellular transport of virus* and *regulation of intracellular transport of viral material* processes. The remaining 35 proteins (32,3%) are somehow related to one or both of these processes:

- No secretome proteins have displayed a strong relationship with the studied processes.
- These 35 proteins have shown a medium relationship with the *intracellular transport of virus* and/or the *regulation of intracellular transport of viral material* processes. None of them are known effectors of these processes.

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 67 proteins (66,3%) display a low or no relationship with both *viral life cycle* and *regulation of viral life cycle* processes. The remaining 34 proteins (33,7%) are somehow related to one or both of these processes:

- No transcriptome protein has displayed a strong relationship with these processes.
- 34 proteins have shown a medium relationship with the *intracellular transport of virus* and/or the *regulation of intracellular transport of viral material* processes. Of note, none of them are known effectors of these processes.

4.2.4 VIRAL GENOME REPLICATION

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 76 proteins (59,8%) display a low or no relationship with the *DNA-dependent DNA replication* and *regulation of DNA-dependent DNA replication* processes. The remaining 51 proteins (40,2%) are somehow related to one or both of these processes:

- Eight proteins are predicted to have a strong relationship with these processes (Table 30):
 - ✓ No secretome proteins have displayed a very high relationship with these processes.

- ✓ Four proteins, **GMNN**, **FGB**, **ICAM1** and **TNFRSF8** have displayed a high relationship with *DNA-dependent DNA replication*, but **only GMNN is listed as one of its effector proteins**. All these proteins are significantly upregulated among the responders, except for ICAM1 that is downregulated.

GMNN has also displayed a high relationship with the *regulation of DNA-dependent DNA replication* process. This protein is listed as its effector.

- ✓ **TGFBR2**, **TNFRSF10A**, **FGG** and **FGA** have achieved a medium-high relationship score with the *DNA-dependent DNA replication*, although **not being listed as its effectors**. Among these, TNFRSF10A, FGG and FGA are upregulated in the responders' cohort, while TGFBR2 are downregulated in the same cohort.

No secretome proteins have displayed a medium-high relationship with the *regulation of DNA-dependent DNA replication*.

- The remaining 43 proteins have shown a medium relationship with the *DNA-dependent DNA replication* and/or the *regulation of DNA-dependent DNA replication* processes. None of these proteins are known effectors of these processes.

TABLE 30. SECRETOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL GENOME REPLICATION.

THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SIGN OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O75496	GMNN	↑	✓	83,07	DNA-dependent DNA replication	✗
P02675	FGB	↑	✗	79,71	DNA-dependent DNA replication	✓
P05362	ICAM1	↓	✗	79,47	DNA-dependent DNA replication	✓
P28908	TNFRSF8	↑	✗	79,36	DNA-dependent DNA replication	✓
P37173	TGFBR2	↓	✗	77,59	DNA-dependent DNA replication	✓
O00220	TNFRSF10A	↑	✗	75,77	DNA-dependent DNA replication	✗
P02679	FGG	↑	✗	75,49	DNA-dependent DNA replication	✓
P02671	FGA	↑	✗	74,65	DNA-dependent DNA replication	✓
O75496	GMNN	↑	✓	78,49	regulation of DNA-dependent DNA replication	✗

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 51 proteins (50,5%) display a low or no relationship with both *DNA-dependent DNA replication* and *regulation of DNA-dependent DNA replication* processes. The remaining 50 proteins (49,5%) are somehow related to one or both of these processes:

- Nine proteins are predicted to have a strong relationship with the viral genome replication motive (Table 31):

- ✓ **DSCC1** has displayed a very high relationship with *regulation DNA-dependent DNA replication*, a process for which the protein is listed as an effector. Its mRNA levels are upregulated among the responders cohort.
- ✓ **RNASEH1** and **NDRG1** have shown a high relationship with the *DNA-dependent DNA replication*. NDRG1 is **not listed as effector protein** of the process. RNASEH1 mRNA levels are upregulated among the responders cohort and NDRG1 mRNA levels are downregulated.

No proteins have displayed a high relationship with *regulation of DNA-dependent DNA replication* process.

- ✓ **STIP1**, **TNKS2**, **NIFK**, **DEK**, **KIF2A** and **BMPR1B** have displayed a medium-high relationship with the *DNA-dependent DNA replication*. None of them is listed as an effector of this process. mRNA levels of STIP1, NIFK, DEK, KIF2A and BMPR1B are upregulated among responders cohort, while TNKS2 mRNA levels are downregulated.

No proteins have displayed a medium-high relationship with *regulation of DNA-dependent DNA replication* process.

- 41 additional proteins have shown a medium relationship with the *DNA-dependent DNA replication* and/or the *regulation of DNA-dependent DNA replication* processes. None of these proteins is listed as an effector of this process.

TABLE 31. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A VERY-HIGH, HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL GENOME REPLICATION. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O60930	RNASEH1	↑	✓	86,24	DNA-dependent DNA replication	✓
Q92597	NDRG1	↓	✗	81,59	DNA-dependent DNA replication	✗
P31948	STIP1	↑	✗	77,56	DNA-dependent DNA replication	✗
Q9H2K2	TNKS2	↓	✗	76,73	DNA-dependent DNA replication	✗
Q9BYG3	NIFK	↑	✗	76,00	DNA-dependent DNA replication	✗
P35659	DEK	↑	✗	75,97	DNA-dependent DNA replication	✗
O00139	KIF2A	↑	✗	75,71	DNA-dependent DNA replication	✗
O00238	BMPR1B	↑	✗	75,53	DNA-dependent DNA replication	✗
Q9BVC3	DSCC1	↑	✓	94,56	regulation of DNA-dependent DNA replication	✗

4.2.5 VIRAL GENE EXPRESSION

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 27 proteins (21,3%) display a low or no relationship with the general **process** of *viral gene expression*. The remaining 100 proteins (78,7%) are somehow related to this process:

- No secretome proteins have displayed a strong relationship with the general process.
- These 100 proteins have shown a medium relationship with the *viral gene expression* process. ANG and IL6 are listed as effectors of this process.

Considering the **subprocesses** included in the *viral gene expression* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 32):

- **CNTF** has displayed a medium-high relationship with the *translation* process.
- **SFRP4, ANG, VWF** and **TNFRSF10A** have achieved a medium-high relationship with the *regulation of translation* process.
- No proteins have achieved a strong relationship with *viral transcription, regulation of viral transcription, viral translation or the RNA modification*.

TABLE 32. SECRETOME PROTEINS WITH A MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL GENE EXPRESSION. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P26441	CNTF	↑	✗	74,36	translation	✓
Q6FHJ7	SFRP4	↓	✗	77,02	regulation of translation	✓
P03950	ANG	↓	✓	76,07	regulation of translation	✓
P04275	VWF	→	✗	75,71	regulation of translation	✓
O00220	TNFRSF10A	↑	✗	74,10	regulation of translation	✗

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 24 proteins (23,8%) display a low or no relationship with the general process of *viral gene expression*. The remaining 77 (76,2%) proteins are somehow related to this process (Table 33):

- No proteins have displayed a strong relationship with *viral gene expression*.
- 77 proteins have obtained a medium relationship score with *viral gene expression*. EIF4E, EGFR, PCBP2, TPRKB, PUS3 and CNOT6 are listed effectors of this process.

Taking into account the subprocesses included in the *viral gene expression* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 33):

- There is one protein that has achieved a high relationship with the *regulation of viral transcription* process, **RAB29**. **MEMO1** has displayed a medium-high relationship.
- **TPRKB** has achieved a very high relationship with the *RNA modification* process.
- **PCBP2** has displayed a high relationship with the *viral translation* process.
- **CLUH** has achieved a medium-high relationship with *translation*.
- **XBP1**, **MEMO1**, **ZNF576**, **NIPSNAP1** and **HMOX2** have displayed a medium-high relationship with the *regulation of translation* process.
- No proteins have achieved a strong relationship with *viral transcription*.

TABLE 33. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A VERY-HIGH, HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL GENE EXPRESSION. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O14966	RAB29	↓	✗	78,42	regulation of viral transcription	✗
Q9Y316	MEMO1	↓	✗	75,19	regulation of viral transcription	✗
Q9Y3C4	TPRKB	↓	✓	93,15	RNA modification	✗
O75153	CLUH	↓	✗	74,04	translation	✓
P17861	XBP1	↑	✗	77,73	regulation of translation	✗
Q9Y316	MEMO1	↓	✗	76,01	regulation of translation	✗
Q9H609	ZNF576	↓	✗	75,18	regulation of translation	✗
Q9BPW8	NIPSNAP1	↓	✗	74,23	regulation of translation	✗
P30519	HMOX2	↓	✗	74,14	regulation of translation	✗
Q15366	PCBP2	↓	✓	78,15	viral translation	✗

4.2.6 VIRION ASSEMBLY

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 101 proteins (79,5%) display a low or no relationship with virion assembly. The remaining 26 proteins (20,5%) are somehow related to process:

- One protein is predicted to have a strong relationship with virion assembly (Table 34):
 - ✓ No proteins have displayed a very high and high relationship with the process.

- ✓ **MMP10** has displayed a medium-high relationship with the *virion assembly* process but is **not listed as one of its effector proteins**. MMP10 is found significantly downregulated among the responders.
- The remaining 25 proteins have shown a medium relationship with the *virion assembly* process. None of these proteins are known effectors of this process.

TABLE 34. SECRETOME PROTEINS WITH A MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRION ASSEMBLY. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SIGN OF THE OBSERVED REGULATION (↓ = DOWN). THE LAST COLUMN “SECRETED” INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P09238	MMP10	↓	✗	74,77	virion assembly	✓

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 75 proteins (74,2%) display a low or no relationship with virion assembly. The remaining 26 proteins (35,8%) are somehow related to the process:

- Two proteins are predicted to have a strong relationship with the virion assembly motive (Table 35):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with *virion assembly*.
 - ✓ **CHMP2A** has shown a high relationship with the *virion assembly* and it is listed as effector protein of the process. Of note, CHMP2A mRNA levels are upregulated among the responders cohort.
 - ✓ **MMP10** has displayed a medium-high relationship with the *virion assembly* but it is **not listed as an effector** of this process. mRNA levels of MMP10 are upregulated among responders cohort.
- 24 additional proteins have shown a medium relationship with the *virion assembly* process. None of these proteins is listed as an effector of this process.

TABLE 35. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRION ASSEMBLY. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SIGN OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O43633	CHMP2A	↑	✓	88,52	virion assembly	✗
P09238	MMP10	↑	✗	74,77	virion assembly	✓

4.2.7 VIRAL RELEASE FROM HOST CELL

SECRETOME

From the 103 differential proteins detected in the secretome analysis, 86 proteins (81,1%) display a low or no relationship with the *viral release from host cell* and *regulation of viral release from host cell* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 24 proteins (28,9%) are somehow related to the one or both of these processes:

- No secretome proteins have displayed a strong relationship with the studied processes.
- The 24 proteins have shown a medium relationship with the *intracellular transport of virus* and/or the *regulation of intracellular transport of viral material* processes. None of them are known effectors of these processes.

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 80 proteins (79,2%) display a low or no relationship with both *viral release from host cell* and *regulation of viral release from host cell* processes, as described in GO databases [1, 2]. The remaining 21 proteins (20,8%) are somehow related to the one or both of these processes:

- A single protein is predicted to have a strong relationship with the viral release from host cell motive (Table 36):
 - ✓ No transcriptome proteins have displayed a very high relationship with these processes.
 - ✓ **CHMP2A** has shown a high relationship with the *regulation of viral release from host cell* and it is listed as effector protein of the process. Of note, CHMP2A mRNA levels are upregulated among the responders cohort.

No proteins have displayed a high relationship with *viral release from host cell*.

- ✓ No transcriptome proteins have displayed a medium-high relationship with these processes.
- The 20 additional proteins have shown a medium relationship with **the viral release from host cell and/or the regulation of viral release from host cell** processes. None of them are known effectors of these processes.

TABLE 36. TRANSCRIPTOME PROTEIN WITH A HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL RELEASE FROM HOST CELL. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
O43633	CHMP2A	↑	✓	85,04	regulation of viral release from host cell	✗

4.2.8 VIRAL LATENCY

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 109 proteins (85%) display a low or no relationship with viral latency. The remaining 18 proteins (15%) are somehow related to this process:

- No secretome proteins have displayed a strong relationship with viral latency.
- These 18 proteins have shown a medium relationship with the *viral latency* process. None of them are known effectors of this process.

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 82 proteins (81,2%) display a low or no relationship with the viral latency process. The remaining 19 proteins (18,8%) are related to this process:

- No transcriptome protein has displayed a strong relationship with *viral latency*.
- The 19 additional proteins have shown a medium relationship with the *viral latency* process. None of them are known effectors of this process.

4.2.9 VIRAL MODULATION OF CELL PROCESSES

SECRETOME

From the 127 differential proteins detected in the secretome analysis, 118 proteins (92,9%) display a low or no relationship with the general **process** of *viral modulation of cell processes*. The remaining 9 proteins (7,1%) are somehow related to this process:

- One protein is predicted to have a strong relationship with the viral modulation of cell processes, as a whole (Table 37):
 - ✓ No proteins have displayed a very high relationship with the process.
 - ✓ **MMP12** has achieved a high relationship with the *viral modulation of cell processes* and is listed as an effector of this process. This protein is downregulated in the secretome of patients with a positive response to Celyvir.
 - ✓ No proteins have displayed a medium-high relationship with the process.
- The remaining 8 proteins have shown a medium relationship with the *viral modulation of cell processes*. None of them are listed as effectors of this process.

Considering the **subprocesses** included in the *viral modulation of cell processes* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 37):

- **MMP12** has achieved a high relationship with *cellular response to virus*.

- No protein displays a strong relationship with *modulation by virus of host processes*.

TABLE 37. SECRETOME PROTEIN WITH A HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL MODULATION OF CELL SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↓ = DOWN). THE LAST COLUMN "SECRETED" INDICATES WHETHER THE PROTEIN IS REPORTEDLY SECRETED BY HUMAN CELLS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
P39900	MMP12	↓	✓	90,21	viral modulation of cell processes	✓
			✓	80,68	cellular response to virus	

TRANSCRIPTOME

From the 101 differential proteins detected in the transcriptome analysis, 91 proteins (78,2%) display a low or no relationship with the general process of *viral modulation of cell processes*. The remaining 10 (21,8%) proteins are somehow related to this process:

- No transcriptome protein has displayed a strong relationship with *viral modulation of cell processes*, as a whole.
- 10 proteins have obtained a medium relationship score with *viral modulation of cell processes*. None of them is being listed as an effector of this process.

Taking into account the subprocesses included in *viral modulation of cell processes* motive individually several other proteins have been highlighted (Table 38):

- There are two proteins that have achieved a medium-high relationship with the *cellular response to virus* process, **MAVS** and **TRAF3**.
- No proteins display a strong relationship with *modulation by virus of host processes*.

TABLE 38. TRANSCRIPTOME PROTEINS WITH MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL MODULATION OF CELL SUBPROCESSES. THE "CANDIDATE" COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↓ = DOWN).

UniProt ID	Gene name	Candidate (↓ = DOWN)	Effector	ANN Score	Related process	Secreted
Q13114	TRAF3	↓	✗	76,78	cellular response to virus	✗
Q7Z434	MAVS	↓	✗	77,23	cellular response to virus	✗

4.3 PROTEIN COMBINATION ANALYSIS

This section is focused on the predicted relationships between the secretome and transcriptome differentially expressed proteins, combined by pairs, and immune response to virus and viral replication. Its aim is to evaluate each possible dual combination among the differentially expressed proteins in order to elucidate whether the proteins are synergistically more highly related to the conditions of interest as a dual combination than individually, and therefore finding potentially interesting proteins hidden in the single protein analyses.

SECRETOME PROTEIN COMBINATIONS

8001 protein combinations by pairs have been evaluated; this section is focused on those combinations that display at least a medium-high relationship with the immune response to virus and/or viral replication and also show synergy, understanding synergy as a predicted ANN value for the combination at least 20% higher than the maximum individual ANN value of the proteins conforming the pair [6, 7].

The results of the evaluation against the immune response to virus related processes are summarised in Table 39, while the results for the viral replication related processes evaluation are summarised in Table 40.

TABLE 39. COUNT OF SECRETOME PROTEIN COMBINATIONS DETECTED AS VERY HIGHLY, HIGHLY AND MEDIUM-HIGHLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS ASSOCIATED PROCESSES, WITH A SYNERGISTICALLY HIGHER PREDICTED RELATIONSHIPS THAN THE OBTAINED AT INDIVIDUAL PROTEIN LEVEL. SYNERGISTIC COMBINATIONS WITH ALL THE SUBPROCESSES INCLUDED IN EACH MOTIVE ARE TAKEN INTO ACCOUNT.

	# VERY HIGH protein pairs	# HIGH protein pairs	# MEDIUM-HIGH protein pairs
DEFENSE RESPONSE TO VIRUS	0	0	29
VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	0	1	3
INTERFERON RESPONSE	0	0	12
REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	0	0	17
RNA-INTERFERENCE MECHANISMS	0	0	0
ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION	0	0	0
REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	1	4	33
ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE	0	0	0
REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	1	0	4
REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	23	2	27

The complete list of synergistic, strongly-related protein combinations, including the information on the concrete subprocess for which they have obtained at least a medium-high ANN value, is listed in the “Secretome_Combinations” sheets of the excel files “ANNResults_ImmuneResponsetoVirus” and “ANNResults_ViralReplication”.

TABLE 40. COUNT OF SECRETOME PROTEIN COMBINATIONS DETECTED AS VERY HIGHLY, HIGHLY AND MEDIUM-HIGHLY RELATED TO VIRAL REPLICATION ASSOCIATED PROCESSES, WITH A SYNERGISTICALLY HIGHER PREDICTED RELATIONSHIPS THAN THE OBTAINED AT INDIVIDUAL PROTEIN LEVEL. SYNERGISTIC COMBINATIONS WITH ALL THE SUBPROCESSES INCLUDED IN EACH MOTIVE ARE TAKEN INTO ACCOUNT.

	# VERY HIGH protein pairs	# HIGH protein pairs	# MEDIUM-HIGH protein pairs
VIRAL LIFE CYCLE	0	0	8
VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	0	10	16
INTRACELLULAR TRANSPORT OF VIRUS	0	0	0
VIRAL GENOME REPLICATION	0	0	0
VIRAL GENE EXPRESSION	0	0	0
VIRION ASSEMBLY	0	0	0
VIRAL RELEASE FROM HOST CELL	0	0	0
VIRAL LATENCY	0	0	0
VIRAL MODULATION OF CELL PROCESSES	0	0	0

TRANSCRIPTOME PROTEIN COMBINATIONS

6328 protein combinations by pairs have been evaluated; this section is focused on those combinations that display at least a medium-high relationship with the immune response to virus and/or viral replication and also show synergy, understanding synergy as a predicted ANN value for the combination at least 20% higher than the maximum individual ANN value of the proteins conforming the pair [6, 7].

The results of the evaluation against the immune response to virus related processes are summarised in Table 41, while the results for the viral replication related processes evaluation are summarised in Table 42.

TABLE 41. COUNT OF TRANSCRIPTOME PROTEIN COMBINATIONS DETECTED AS VERY HIGHLY, HIGHLY AND MEDIUM-HIGHLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS ASSOCIATED PROCESSES, WITH A SYNERGISTICALLY HIGHER PREDICTED RELATIONSHIPS THAN THE OBTAINED AT INDIVIDUAL PROTEIN LEVEL. SYNERGISTIC COMBINATIONS WITH ALL THE SUBPROCESSES INCLUDED IN EACH MOTIVE ARE TAKEN INTO ACCOUNT.

	# VERY HIGH protein pairs	# HIGH protein pairs	# MEDIUM-HIGH protein pairs
DEFENSE RESPONSE TO VIRUS	0	0	48
VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	0	7	20
INTERFERON RESPONSE	0	0	3
REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	0	0	1
RNA-INTERFERENCE MECHANISMS	0	0	0
ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION	0	0	0
REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	0	0	5
ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE	0	0	0
REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	0	1	23
REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	0	0	3

TABLE 42. COUNT OF TRANSCRIPTOME PROTEIN COMBINATIONS DETECTED AS VERY HIGHLY, HIGHLY AND MEDIUM-HIGHLY RELATED TO VIRAL REPLICATION ASSOCIATED PROCESSES, WITH A SYNERGISTICALLY HIGHER PREDICTED RELATIONSHIPS THAN THE OBTAINED AT INDIVIDUAL PROTEIN LEVEL. SYNERGISTIC COMBINATIONS WITH ALL THE SUBPROCESSES INCLUDED IN EACH MOTIVE ARE TAKEN INTO ACCOUNT.

	# VERY HIGH protein pairs	# HIGH protein pairs	# MEDIUM-HIGH protein pairs
VIRAL LIFE CYCLE	3	4	15
VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	0	16	18
INTRACELLULAR TRANSPORT OF VIRUS	0	0	0
VIRAL GENOME REPLICATION	0	0	3
VIRAL GENE EXPRESSION	4	31	0
VIRION ASSEMBLY	0	0	0
VIRAL RELEASE FROM HOST CELL	0	0	0
VIRAL LATENCY	0	0	0
VIRAL MODULATION OF CELL PROCESSES	0	0	0

The complete list of synergic, strongly-related protein combinations, including the information on the specific subprocess for which they have obtained at least a medium-high ANN value, is listed in the “Transcriptome_Combinations” sheets of the “ANNResults_ViralReplication” and “ANNResults_ImmuneResponsetoVirus” excel files.

4.4 GRAPHICAL REPRESENTATION:

A cytoscape² [8] session named “Celyvir_Network_ANN.cys”³ has been generated including the differentially expressed genes/proteins (transcriptome), differentially secreted proteins (secretome), protein effectors implicated in the immune response to virus or viral replication and the relationships among them.

Inside this session, two networks have been generated, one for the immune response to virus (*Immune Response To Virus*) and another for viral replication (*Viral Replication*). In addition, each of these networks also includes a subnetwork (*Immune Response To Virus_Strong* and *Viral Replication_Strong*) containing only the strongly related proteins (with an ANN Score ranging between very high and medium-high) and their linked protein effectors.

² Open-source network visualization software downloadable from:

<http://www.cytoscape.org/download.php>

³ When opening the network with cytoscape software, the user may need to select the Style named “Celyvir” to correctly see the format according to the provided legend.

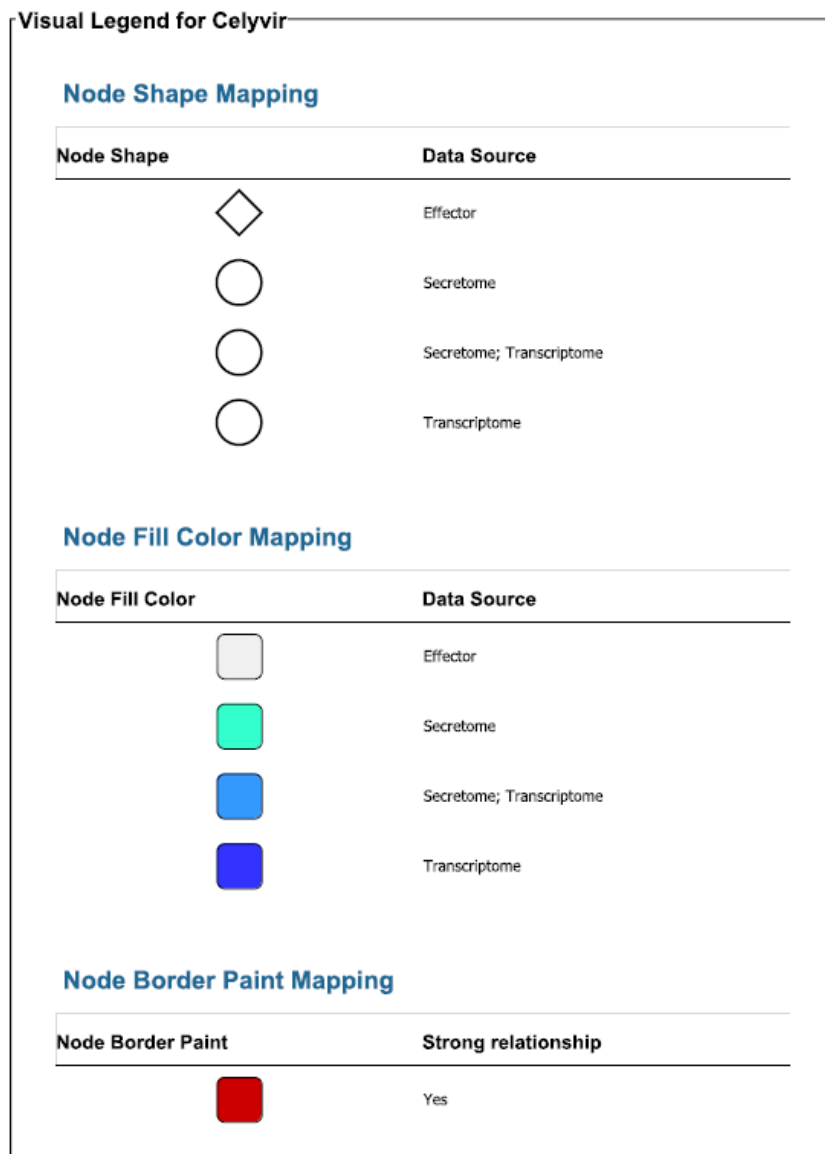


FIGURE 2. "CELYVIR_NETWORK_ANN.CYS" VISUAL LEGEND.

Note: protein MMP10 is present in both differentially expressed genes/proteins (transcriptome) and differentially secreted proteins (secretome) data, with a different sign of regulation in each (downregulated in the secretome analysis and upregulated in the transcriptome analysis). That is why a special tag has been generated for protein MMP10 for the "regulation" variable ("9" meaning that both an upregulation ("1") and downregulation ("-1") are detected) and for the "Data Source" variable ("Secretome; Transcriptome").

5 KEY FINDINGS

5.1 SECRETOME DIFFERENTIAL PROTEINS

75 differentially expressed proteins from the supernatant (secretome) of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders and non-responders have shown a strong relationship⁴ with the:

- **immune response to virus** (71 proteins) and/or
- **viral replication** (24 proteins).

Table 43 (immune response to virus) and Table 44 (viral replication) summarize this information, indicating the percentage of proteins presenting a strong relationship with at least one of the subprocesses defining the processes.

TABLE 43. SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Regulation of leukocyte migration	24%	11%	13%
Regulation of adaptive immune response	17%	8%	9%
Virus sensing PRR signalling	13%	7%	6%
Regulation of innate immune response	12%	4%	8%
Regulation of leukocyte differentiation	9%	2%	6%
Interferon response	7%	6%	2%
Defense response to virus	5%	2%	2%
Antigen processing and presentation mechanisms	3%	1%	2%

TABLE 44. SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Related process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Viral genome replication	7%	5%	2%
Viral life cycle	6%	3%	2%
Viral entry into host cell	5%	2%	3%
Viral gene expression	3%	2%	2%
Viral modulation of cell processes	2%	0%	2%
Virion assembly	1%	0%	1%

Some proteins can be highlighted for the strength of their relationship with:

⁴ Proteins with an ANN Score ranging between a very high and a medium-high relationship are considered proteins with a strong relationship.

The complete information on these proteins is detailed in the "Secretome_KeyFindings" sheets of the "ANNResults_ImmuneResponseToVirus" and "ANNResults_ViralReplication" excel files.

- the **immune response to virus**, namely **IL6, IL10, IL6R, IL4, CCL2** and **FGA**, strongly related to at least 6 different subprocesses implicated in the immune response to virus;
- the **viral replication**, namely **GMNN, MMP12, FGB, ICAM1** and **TNFRSF10A**, which are strongly related to at least 2 different subprocesses implicated in viral replication.

In addition, there are **24 immune response strongly related proteins** (Table 45) and **18 viral replication strongly related proteins** (Table 46) whose implication **these processes has not been previously described** [1, 2].

TABLE 45. SECRETED NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IMMUNE RESPONSE TO VIRUS RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	MAX ANN Score	MAX related Process	MAX related Subprocess
Q13007	IL24	↓	81,94	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P01241	GH1	↓	79,67	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P26441	CNTF	↑	79,32	REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	regulation of chemokine production
O95813	CER1	↓	78,50	INTERFERON RESPONSE	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
O75496	GMNN	↑	78,07	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
Q96NZ8	WFIKK1	↓	77,92	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q6FHJ7	SFRP4	↓	77,63	ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION MECHANISMS	antigen processing and presentation
P01588	EPO	↑	77,25	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
Q8TEU8	WFIKK2	↓	77,11	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q6EMK4	VASN	↑	76,71	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
P40225	THPO	↓	76,65	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
O43508	TNFSF12	↓	75,88	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
P21815	IBSP	↑	75,67	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte chemotaxis
Q9H3Y6	SRMS	→	74,92	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
P00747	PLG	↓	74,91	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	leukocyte differentiation
P50591	TNFSF10	↑	74,76	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	leukocyte differentiation
P31025	LCN1	↑	74,69	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	Viral sensing PRR signalling
P08138	NGFR	↑	74,61	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	Viral sensing PRR signalling

UniProt	Gene	Candidate	MAX	MAX related Process	MAX related Subprocess
P01236	PRL	↓	74,30	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P04085	PDGFA	↓	74,25	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
P28799	GRN	↓	74,23	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response
P42685	FRK	↑	74,15	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
Q9P0M4	IL17C	↓	74,05	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte chemotaxis
P48023	FASLG	↓	74,04	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response

TABLE 46. SECRETED NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL REPLICATION RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	MAX ANN Score	MAX related process	MAX related subprocess
P02675	FGB	↑	79,71	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P08138	NGFR	↑	79,56	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
P28908	TNFRSF8	↑	79,36	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P37173	TGFBR2	↓	77,59	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P21359	NF1	↓	77,28	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
Q6FHJ7	SFRP4	↓	77,02	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
O00220	TNFRSF10A	↑	75,77	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P04275	VWF	→	75,71	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
P02679	FGG	↑	75,49	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P01241	GH1	↓	75,13	VIRAL LIFE CYCLE	regulation of viral life cycle
P04085	PDGFA	↓	75,05	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
Q14766	LTBP1	↑	75,04	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
P09238	MMP10	↓	74,77	VIRION ASSEMBLY	virion assembly
P02671	FGA	↑	74,65	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P80370	DLK1	↓	74,55	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
P49767	VEGFC	↑	74,52	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
P26441	CNTF	↑	74,36	VIRAL GENE EXPRESSION	translation
P01127	PDGFB	↓	74,23	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell

5.2 TRANSCRIPTOME DIFFERENTIAL PROTEINS

44 differentially expressed proteins detected in the transcriptome of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders and non-responders have shown a strong relationship⁵ with the:

⁵ Proteins with an ANN Score ranging between a very high and a medium-high relationship are considered proteins with a strong relationship.

- **immune response to virus** (29 proteins) and/or
- **viral replication** (26 proteins).

Table 47 (immune response to virus) and Table 48 (viral replication) summarize this information, indicating the percentage of proteins presenting a strong relationship with at least one of the subprocesses defining the processes.

TABLE 47. GENE CANDIDATES MOST STRONGLY RELATED TO IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Interferon response	10%	4%	6%
Regulation of leukocyte migration	7%	3%	4%
Regulation of leukocyte differentiation	6%	4%	3%
Regulation of adaptive immune response	4%	3%	2%
Defense response to virus	4%	1%	3%
Virus sensing PRR signalling	4%	1%	3%
Regulation of innate immune response	3%	1%	2%
RNA interference mechanisms	2%	1%	1%

TABLE 48. GENE CANDIDATES MOST STRONGLY RELATED TO VIRAL REPLICATION PROCESSES. UPREGULATED PROTEINS AND PROTEINS ONLY DETECTED IN THE RESPONDERS' SAMPLES ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %" COLUMN, DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %".

Related process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Viral gene expression	8%	1%	7%
Viral genome replication	8%	6%	2%
Viral life cycle	6%	4%	3%
Viral entry into host cell	4%	2%	2%
Virion assembly	2%	2%	0%
Viral modulation of cell processes	2%	0%	2%
Viral release from host cell	1%	1%	0%

Some transcriptome proteins can be highlighted for their strong relationship with:

- the **immune response to virus**, namely **TRAF3**, **MAVS**, **PCBP2**, **FASN** and **NDRG1**, which are strongly related to at least 3 different subprocesses implicated in the immune response to virus;
- the **viral replication**, namely **CHMP2A**, **CLEC5A**, **XBP1**, **BMPIR1B**, **MAVS**, **RAB29**, **TRAF3** and **MEMO1**, strongly related to at least 2 different subprocesses implicated in viral replication.

In addition, there are **21 immune response strongly related proteins** (Table 49) and **16 viral replication-related processes strongly related proteins** (Table 49). Gene candidates non-

The complete information on these proteins is detailed in the "Transcriptome_KeyFindings" sheets of the "ANNResults_ImmuneResponseToVirus" and "ANNResults_ViralReplication" excel files.

effector proteins with a high and medium-high relationship with immune response to virus related subprocesses. The “Candidate” column indicates the sign of the observed regulation (\uparrow = up/ \downarrow = down/ \rightarrow = responders only). The MAX columns indicate the highest value of relationship attained by that protein, and with which general process and concrete subprocess.

UniProt ID	Gene name	Candidate (\uparrow = UP/ \downarrow = DOWN)	MAX ANN Score	MAX related Process	MAX related Subprocess
P50552	VASP	\downarrow	84,12	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	cellular extravasation
Q9C0K1	SLC39A8	\uparrow	80,63	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of immunoglobulin mediated immune response
P35659	DEK	\uparrow	78,83	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
Q9ULM6	CNOT6	\uparrow	78,72	INTERFERON RESPONSE	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
Q92597	NDRG1	\downarrow	78,37	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of adaptive immune response
Q9H269	VPS16	\downarrow	77,76	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated cytotoxicity
Q96QV1	HHIP	\downarrow	77,28	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q96S59	RANBP9	\uparrow	76,94	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
P31948	STIP1	\uparrow	76,03	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
P06730	EIF4E	\downarrow	75,98	INTERFERON RESPONSE	IFN gamma response
Q6MZP7	LIN54	\uparrow	75,04	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
O43633	CHMP2A	\uparrow	74,74	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q9P1U0	ZNRD1	\downarrow	74,60	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
Q8NI35	INADL	\downarrow	74,54	REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	regulation of inflammatory response
P15559	NQO1	\downarrow	74,42	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
P57739	CLDN2	\downarrow	74,38	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q8IWZ8	SUGP1	\uparrow	74,36	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q12834	CDC20	\downarrow	74,36	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response
Q96DD0	LRRC39	\uparrow	74,30	INTERFERON RESPONSE	response to interferon-gamma
Q9Y316	MEMO1	\downarrow	74,24	RNA INTERFERENCE MECHANISMS	RNA interference
Q9H2K2	TNKS2	\downarrow	74,10	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration

Table 50) that are **not described as implicated in these processes**[1, 2].

TABLE 49. GENE CANDIDATES NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IMMUNE RESPONSE TO VIRUS RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN)	MAX ANN Score	MAX related Process	MAX related Subprocess
P50552	VASP	↓	84,12	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	cellular extravasation
Q9C0K1	SLC39A8	↑	80,63	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of immunoglobulin mediated immune response
P35659	DEK	↑	78,83	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
Q9ULM6	CNOT6	↑	78,72	INTERFERON RESPONSE	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
Q92597	NDRG1	↓	78,37	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of adaptive immune response
Q9H269	VPS16	↓	77,76	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated cytotoxicity
Q96QV1	HHIP	↓	77,28	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q96S59	RANBP9	↑	76,94	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
P31948	STIP1	↑	76,03	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of leukocyte differentiation
P06730	EIF4E	↓	75,98	INTERFERON RESPONSE	IFN gamma response
Q6MZP7	LIN54	↑	75,04	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
O43633	CHMP2A	↑	74,74	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q9P1U0	ZNRD1	↓	74,60	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
Q8NI35	INADL	↓	74,54	REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	regulation of inflammatory response
P15559	NQO1	↓	74,42	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
P57739	CLDN2	↓	74,38	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q8IWZ8	SUGP1	↑	74,36	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
Q12834	CDC20	↓	74,36	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response
Q96DD0	LRRC39	↑	74,30	INTERFERON RESPONSE	response to interferon-gamma
Q9Y316	MEMO1	↓	74,24	RNA INTERFERENCE MECHANISMS	RNA interference
Q9H2K2	TNKS2	↓	74,10	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration

TABLE 50. GENE CANDIDATES NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL REPLICATION RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP / ↓ = DOWN)	MAX ANN Score	MAX related Process	MAX related Subprocess
Q92597	NDRG1	↓	81,59	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P52803	EFNA5	↓	78,39	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
P17861	XBP1	↑	77,73	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
P31948	STIP1	↑	77,56	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
Q13114	TRAF3	↓	77,06	VIRAL MODULATION OF CELL PROCESSES	cellular response to virus
Q9H2K2	TNKS2	↓	76,73	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
Q9Y316	MEMO1	↓	76,01	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
Q9BYG3	NIFK	↑	76,00	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
O00238	BMPR1B	↑	75,93	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
O00139	KIF2A	↑	75,71	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
Q9H609	ZNF576	↓	75,18	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
P09238	MMP10	↑	74,77	VIRION ASSEMBLY	virion assembly
P19404	NDUFV2	↓	74,55	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
Q9BPW8	NIPSNAP1	↓	74,23	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
P30519	HMOX2	↓	74,14	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
O75153	CLUH	↓	74,04	VIRAL GENE EXPRESSION	translation

In conclusion, further research on the strongly related proteins could be key for the elucidation of factors associated with the response to Celyvir treatment in neuroblastoma patients.

The proteins not described as effectors are of special interest (Tables 45, 46, 49, 50), due to their potential novel role in the studied processes, which could provide added value to the performed research.

6 RECOMMENDED NEXT STEPS

In view of the result obtained, some considerations to completely exploit the information generated have to be taken into account:

- We recommend **experimentally validating** the role of the proteins highlighted in each process in the response to Celyvir. We especially encourage the exploration of those for which no information relating them to the immune response to virus and/or viral replication is listed in GO databases [1, 2] (Tables 43, 44, 47, 48).
- The most relevant proteins regarding their relationship to the processes of interest have been highlighted along the present report. However, a **comprehensive review of the complete results by the client is recommended** in order to fully exploit the generated results.
 - o We especially recommend the evaluation of the medium rated proteins (e.g. ANN score over 70%), in order to identify more innovative effectors, that can even provide information on less known branches inside the processes.
 - o This is especially important in some processes where annotated information might be lacking or scarce, and for which no or few strong relationships have been found: *antigen processing and presentation, antitumor immune response, intracellular transport of virus, viral release from host cell, viral latency, viral modulation of cell processes*, among others.
- The models generated for the execution of the project can be further evaluated in order to:
 - o Detail the **molecular mechanisms** relating a **protein or groups of proteins** of special interest for the client **with the phenotype or any specific process** of interest.

Anaxomics can provide assistance in any of the suggested next steps upon client's request.

7 BIBLIOGRAPHY

1. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
2. The Gene Ontology, C., *Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D331-D338.
3. Louis, C.U. and J.M. Shohet, *Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy*. Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 49-63.
4. Melen, G.J., et al., *Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells*. Cancer Lett, 2016. **371**(2): p. 161-70.
5. Bishop, C.M., *Pattern recognition and machine learning*. Information science and statistics. 2006, New York: Springer. xx, 738 p.
6. Berenbaum, M.C., *What is synergy?* Pharmacol Rev, 1989. **41**(2): p. 93-141.
7. Lehar, J., et al., *Chemical combination effects predict connectivity in biological systems*. Mol Syst Biol, 2007. **3**: p. 80.
8. Shannon, P., et al., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003. **13**(11): p. 2498-504.

8 ANNEXES

8.1 ANNEX 1: EXCEL FILE LEGEND

SECRETOME SHEET

The “Secretome” sheet includes columns with the following information:

- **UNIPROT ID.** This column includes the UniProt ID code for each studied protein.
- **GENE NAME.** This column includes the gene name stated in UniProt for each protein.
- **CLIENT’S DATA NAME.** This column includes the name found in the original data provided by the client for each studied protein.
- **CANDIDATE (↑ = UP/↓ = DOWN/ → = responders only).** This column informs on the detected up/downregulation or exclusive presence among responders detected for each protein in the comparison between secretome data of responders and non-responders to Celyvir treatment, as evaluated in the previous objective of this project.
- **EVALUATED BY ANNs.** This column indicates whether the protein has been successfully evaluated in the ANNs analysis or not. Non-evaluated proteins have no reliable protein-protein links around them, which implies that they cannot be included in Anaxomics’ network.
- **SECRETED.**
 - **Yes/No.** This column indicates whether the protein is a secreted one or not.
 - **Source.** Indicates the source of information used to determine whether a protein is secreted or not.
- **SUBPROCESS NAME.**
 - **Effector.** For each subprocess evaluated, indicates whether the protein is described as an effector of such process in GO databases or not [1, 2].
 - **ANN Score.** For each subprocess evaluated, indicates the value of ANN Score obtained for the protein’s relationship with the process. Aiming to facilitate the understanding of the results, it has been divided in five categories:

ANN value	ANN score	Associated p-value
>92	VERY HIGH	<0,01
78-92	HIGH	0,01-0,05
74-78	MEDIUM-HIGH	0,05-0,075
38-74	MEDIUM	0,075-0,25
<38	LOW	>0,25

TRANSCRIPTOME SHEET

The “Transcriptome” sheet includes columns with the following information:

- **UNIPROT ID.** This column includes the UniProt ID code for each studied protein.
- **GENE NAME.** This column includes the gene name stated in UniProt for each protein.
- **PROTEIN NAME.** This column includes the protein name stated in UniProt for each protein.
- **LOG2FC.** Include the \log_2 of the value of fold change obtained for each protein in the previous objective of this project.
- **CANDIDATE (\uparrow = UP/ \downarrow = DOWN/ \rightarrow = responders only).** This column informs on the detected up/downregulation or exclusive presence among responders detected for each protein in the comparison between transcriptome data of responders and non-responders to Celyvir treatment, as evaluated in the previous objective of this project.
- **EVALUATED BY ANNs.** This column indicates whether the protein has been successfully evaluated in the ANNs analysis or not. Non-evaluated proteins have no reliable protein-protein links around them, which implies that they cannot be included in Anaxomics’ network.
- **FDR VALUE < 0.01.** Indicates whether the protein obtained a corrected FDR value under 0.01 in the statistical analysis performed for the previous objective of this project.
- **SUBPROCESS NAME.**
 - **Effector.** For each subprocess evaluated, indicates whether the protein is described as an effector of such process in GO databases or not [1, 2].
 - **ANN Score.** For each subprocess evaluated, indicates the value of ANN Score obtained for the protein’s relationship with the process. Aiming to facilitate the understanding of the results, it has been divided in five categories:

ANN value	ANN score	Associated p-value
>92	VERY HIGH	<0,01
78-92	HIGH	0,01-0,05
74-78	MEDIUM-HIGH	0,05-0,075
38-74	MEDIUM	0,075-0,25
<38	LOW	>0,25

SECRETOME_KEYFINDINGS AND TRANSCRIPTOME_KEYFINDINGS SHEETS

Both sheets include columns with the following information:

- **UNIPROT ID.** This column includes the UniProt ID code for each protein with a strong relationship with any studied subprocess.
- **GENE NAME.** This column includes the gene name stated in UniProt for each protein with a strong relationship with any studied subprocess.
- **REGULATION.** This column informs on the detected up (↑) or downregulation (↓) or exclusive presence among responders (→) detected for each protein in the comparison between data of responders and non-responders to Celyvir treatment, as evaluated in the previous objective of this project.
- **# RELATED SUBPROCESSES.** Indicates the number of subprocess for which that protein has obtained an ANN Score ranging between a very high and medium-high relationship.
- **LIST OF RELATED SUBPROCESSES.** Indicates the names of those subprocesses for which that protein has obtained an ANN Score ranging between a very high and medium-high relationship.
- **EFFECTOR IN VIRAL REPLICATION/IMMUNE RESPONSE.** Indicates whether the protein is listed as an effector of any of the evaluated subprocesses of viral replication/immune response to virus, as described in Gene Ontology databases [1, 2].
- **MAX ANN SCORE.** Indicates the highest ANN Score obtained by that protein with any of the analysed subprocesses.
- **MAX RELATED PROCESS.** Indicates the name of the motive for whose subprocess the protein has obtained its highest ANN Score.
- **MAX RELATED SUBPROCESS.** Indicates the name of the concrete subprocess for which the protein has obtained its highest ANN Score.

In addition to these, the “Secretome_KeyFindings” sheet includes an additional column:

- **SECRETED.** This column indicates whether the protein is secreted or not according to information from public databases.

SECRETOME_COMBINATIONS AND TRANSCRIPTOME_COMBINATIONS SHEETS

Both sheets include columns with the following information:

- **UNIPROT A.** Indicates the UniProt ID of the first protein included in the analysed combination.
- **GENE NAME A.** Indicates the gene name stated in UniProt of the first protein included in the analysed combination.

- **UNIPROT B.** Indicates the UniProt ID of the second protein included in the analysed combination.
- **GENE NAME B.** Indicates the gene name stated in UniProt of the second protein included in the analysed combination.
- **ANN SCORE A.** Indicates the value of ANN Score obtained individually by the first protein (as a single protein) for its relationship with the studied process.
- **ANN SCORE B.** Indicates the value of ANN Score obtained individually by the second protein (as a single protein) for its relationship with the studied process.
- **COMBINED ANN SCORE (A+B).** Indicates the value of ANN Score obtained by the protein combination for its relationship with the studied process.
- **SYNERGIC SUBPROCESS.** Indicates the name of the subprocess for which the protein combination has obtained a synergic strong relationship.

8.2 ANNEX 2: SECRETOME ALTERNATIVE KEY FINDINGS

This section is a modified version of section 5.1, and it summarizes the key findings related to the secretome proteins. However, here we consider only those proteins known to be secreted, according to information provided by public databases.

70 differentially expressed **known secreted** proteins from the supernatant (secretome) of the MSCs infected with the oncolytic virus from responders and non-responders have shown a strong relationship⁶ with the:

- **immune response to virus** (66 proteins) and/or
- **viral replication** (22 proteins).

Table 51 (immune response to virus) and Table 52 (viral replication) summarize this information, indicating the percentage of proteins presenting a strong relationship with at least one of the subprocesses defining the processes.

TABLE 51. KNOWN SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED IMMUNE RESPONSE TO VIRUS PROCESSES. THE %S TAKE INTO ACCOUNT NOT ONLY THE MAX RELATED PROCESS, BUT ALL THE STRONGLY RELATED ONES TO EACH PROTEIN, OVER THE 71 STRONGLY RELATED PROTEINS. UPREGULATED AND RESPONDERS-FOUND ONLY PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %", ONLY DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %". THESE %S ARE CALCULATED REGARDING THE TOTAL 103 KNOWN SECRETED PROTEINS IN THE SECRETOME DATA.

Process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Regulation of leukocyte migration	29%	14%	16%
Regulation of adaptive immune response	20%	9%	12%
Regulation of innate immune response	13%	7%	5%
Virus sensing PRR signalling	14%	5%	8%
Regulation of leukocyte differentiation	11%	3%	8%
Interferon response	7%	6%	0%
Defense response to virus	6%	3%	3%
Antigen processing and presentation mechanisms	4%	1%	3%

TABLE 52. KNOWN SECRETED PROTEINS MOST STRONGLY RELATED TO VIRAL REPLICATION PROCESSES. THE %S TAKE INTO ACCOUNT NOT ONLY THE MAX RELATED PROCESS, BUT ALL THE STRONGLY RELATED ONES TO EACH PROTEIN, OVER THE 24 STRONGLY RELATED PROTEINS. UPREGULATED AND RESPONDERS-FOUND ONLY PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "RESPONDERS %", ONLY DOWNREGULATED PROTEINS ARE INCLUDED IN THE "NON-RESPONDERS %"; ALL ARE INCLUDED IN "TOTAL %". THESE %S ARE CALCULATED REGARDING THE TOTAL 103 KNOWN SECRETED PROTEINS IN THE SECRETOME DATA.

Related process	TOTAL %	Responders %	Non-responders %
Viral genome replication	7%	4%	3%
Viral life cycle	6%	3%	3%

⁶ Proteins with an ANN Score ranging between a very high and a medium-high relationship are considered proteins with a strong relationship.

The complete information on these proteins is detailed in the "Secretome_KeyFindings" sheets of the "ANNResults_ImmuneResponseToVirus" and "ANNResults_ViralReplication" excel files.

Viral entry into host cell	6%	2%	4%
Viral gene expression	3%	1%	2%
Viral modulation of cell processes	2%	0%	2%
Virion assembly	1%	0%	1%

Some proteins can be highlighted for the strength of their relationship with:

- the **immune response to virus**, namely **IL6**, **IL10**, **IL6R**, **IL4**, **CCL2** and **FGA**, strongly related to at least 6 different subprocesses implicated in the immune response to virus;
- the **viral replication**, namely **MMP12**, **FGB** and **ICAM1**, which are strongly related to at least 2 different subprocesses implicated in viral replication.

In addition, there are **22 immune response strongly related proteins** (Table 53) and **17 viral replication strongly related proteins** (Table 54) that are **not described as implicated in these processes** [1, 2].

TABLE 53. SECRETOME NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH IMMUNE RESPONSE TO VIRUS RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	MAX ANN Score	MAX related Process	MAX related Subprocess
Q13007	IL24	↓	81,94	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P01241	GH1	↓	79,67	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P26441	CNTF	↑	79,32	REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE	regulation of chemokine production
O95813	CER1	↓	78,50	INTERFERON RESPONSE	regulation of type I interferon-mediated signaling pathway
Q96NZ8	WFIKKN1	↓	77,92	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q6FHJ7	SFRP4	↓	77,63	ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION MECHANISMS	antigen processing and presentation
P01588	EPO	↑	77,25	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
Q8TEU8	WFIKKN2	↓	77,11	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	regulation of T cell differentiation
Q6EMK4	VASN	↑	76,71	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte migration
P40225	THPO	↓	76,65	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
O43508	TNFSF12	↓	75,88	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
P21815	IBSP	↑	75,67	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte chemotaxis
P00747	PLG	↓	74,91	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	leukocyte differentiation

UniProt	Gene	Candidate	MAX	MAX related Process	MAX related Subprocess
P50591	TNFSF10	↑	74,76	REGULATION OF LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	leukocyte differentiation
P31025	LCN1	↑	74,69	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	Viral sensing PRR signalling
P08138	NGFR	↑	74,61	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	Viral sensing PRR signalling
P01236	PRL	↓	74,30	REGULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE	regulation of T cell mediated immunity
P04085	PDGFA	↓	74,25	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
P28799	GRN	↓	74,23	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response
P42685	FRK	↑	74,15	VIRUS SENSING PRR SIGNALLING	toll-like receptor signaling pathway
Q9P0M4	IL17C	↓	74,05	REGULATION OF LEUKOCYTE MIGRATION	leukocyte chemotaxis
P48023	FASLG	↓	74,04	INTERFERON RESPONSE	IFN type I response

TABLE 54. SECRETOME NON-EFFECTOR PROTEINS WITH A HIGH AND MEDIUM-HIGH RELATIONSHIP WITH VIRAL REPLICATION RELATED SUBPROCESSES. THE “CANDIDATE” COLUMN INDICATES THE SING OF THE OBSERVED REGULATION (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = RESPONDERS ONLY). THE MAX COLUMNS INDICATE THE HIGHEST VALUE OF RELATIONSHIP ATTAINED BY THAT PROTEIN, AND WITH WHICH GENERAL PROCESS AND CONCRETE SUBPROCESS.

UniProt ID	Gene name	Candidate (↑ = UP/↓ = DOWN/→ = responders only)	MAX ANN Score	MAX related process	MAX related subprocess
P02675	FGB	↑	79,71	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P08138	NGFR	↑	79,56	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
P28908	TNFRSF8	↑	79,36	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P37173	TGFBR2	↓	77,59	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P21359	NF1	↓	77,28	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
Q6FHJ7	SFRP4	↓	77,02	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P04275	VWF	→	75,71	VIRAL GENE EXPRESSION	regulation of translation
P02679	FGG	↑	75,49	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P01241	GH1	↓	75,13	VIRAL LIFE CYCLE	regulation of viral life cycle
P04085	PDGFA	↓	75,05	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
Q14766	LTBP1	↑	75,04	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell
P09238	MMP10	↓	74,77	VIRION ASSEMBLY	virion assembly
P02671	FGA	↑	74,65	VIRAL GENOME REPLICATION	DNA-dependent DNA replication
P80370	DLK1	↓	74,55	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
P49767	VEGFC	↑	74,52	VIRAL LIFE CYCLE	viral life cycle
P26441	CNTF	↑	74,36	VIRAL GENE EXPRESSION	translation
P01127	PDGFB	↓	74,23	VIRAL ENTRY INTO HOST CELL	viral entry into host cell

Further research on the strongly related proteins could be key for the elucidation of factors associated with the response to Celyvir in neuroblastoma patients.

The protein candidates not described previously as effectors are of special interest, due to their potential novel role in the studied processes, which could provide added value to the performed research.